

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Effets de la pectine de citrus fragmentée sur les cellules cancéreuses A549 et HEPG2 : Caractérisation du type de mort cellulaire induit et du(es) récepteurs(s) impliqué(s)

MINNE, Aurélie

Award date:
2012

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Effets de la pectine de citrus fragmentée sur les cellules cancéreuses A549 et
HepG2 : Caractérisation du type de mort cellulaire induite et du(es)
récepteur(s) potentiel(s)**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Aurélié Minne

Janvier 2012

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Effets de la pectine de Citrus fragmentée sur les cellules cancéreuses A549 et
HepG2 : Caractérisation du type de mort cellulaire induite et du(es)
récepteur(s) potentiel(s)**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Aurélie Minne

Janvier 2012

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles, 61 – 5000 NAMUR
Téléphone : +32(0)81/72.44.18 – Fax : +32(0)81/72.44.20
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be – <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Effets de la pectine de Citrus fragmentée sur les cellules cancéreuses A549 et HepG2 : Caractérisation du type de mort cellulaire induite et du(es) récepteur(s) potentiel(s)

MINNE Aurélie

Résumé

A l'heure actuelle, le cancer représente la maladie la plus mortelle à travers le monde. C'est pourquoi la recherche de nouvelles thérapies efficaces et peu toxiques est nécessaire pour améliorer la prise en charge des patients cancéreux. Depuis quelques années, les scientifiques se sont intéressés à l'utilisation de molécules naturelles, comme les pectines. Celles-ci sont des polysaccharides complexes issus de la paroi des cellules végétales. Il a été montré que la pectine pouvait avoir des effets anticancéreux lorsqu'elle était fragmentée. Cette fragmentation peut se faire par variation de pH ou de température, et par digestion enzymatique.

Dans ce mémoire, nous avons tenté de caractériser le type de mort cellulaire induit dans les cellules cancéreuses par les fragments pectiques issus de la fragmentation de la pectine de citrus par la chaleur (HFCP), mais également de déterminer par quel récepteur ces fragments étaient reconnus.

Premièrement, nous avons montré que, contrairement à la pectine non fragmentée, la HFCP induisait une forte mortalité dans deux lignées de cellules tumorales, les cellules A549 dérivant d'un adénocarcinome pulmonaire humain et les cellules HepG2, dérivant d'un hépatocarcinome humain. Ensuite, nous avons étudié les trois types de mort cellulaire, à savoir l'apoptose (principalement la voie dépendante des caspases), l'autophagie et la nécroptose. Lorsque nous inhibons la voie de l'apoptose dépendante des caspases, nous avons remarqué que la mort cellulaire induite par les fragments ne semblait pas être affectée. Nous avons également inhibé l'autophagie, sans effet marqué sur la cytotoxicité induite par les fragments. Par ailleurs, il semblerait que la nécroptose soit impliquée dans la toxicité des fragments pectiques dans les cellules A549. Enfin, nous avons étudié quatre récepteurs candidats afin de voir par quel récepteur les fragments étaient reconnus. Nous avons choisi la galectine-3, connue pour reconnaître la pectine de citrus fragmentée par des variations de pH, le CD44, le CD168 et le TLR-4, qui sont connus pour reconnaître des polysaccharides comme l'acide hyaluronique. Nous avons inhibé leur expression par siRNA et étudié l'influence de cette invalidation sur la toxicité de la HFCP. Dans le cas des cellules A549, nous n'avons pas réussi à identifier le récepteur. Par contre, dans les cellules HepG2, les récepteurs CD44 et CD168 semblent intervenir dans la reconnaissance des fragments pectiques. Ainsi, bien que de nombreuses questions restent encore actuellement sans réponse, ces résultats permettent de proposer de nouvelles perspectives pour les fragments pectiques dans le traitement des patients atteints du cancer.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2012

Promoteur : C. Michiels

❧ REMERCIEMENTS ❧

En préambule de ce mémoire, je tiens à remercier plusieurs personnes, toutes celles qui m'ont aidées, soutenues et encouragées tout au long de la réalisation de ce travail.

Tout d'abord, je tiens à remercier très chaleureusement ma promotrice, Carine Michiels, qui m'a toujours aidée tout au long de ce mémoire et motivée même dans les moments les plus difficiles. Merci pour votre soutien, votre compréhension, votre disponibilité et vos relectures ! Merci également aux autres seniors, Thierry Arnould, Martine Raes, Patsy Renard, Florence Debacq-Chainiaux et Olivier Toussaint de m'avoir accueillie au sein de l'URBC pendant 10 mois.

Ensuite, je souhaite remercier Lionel Leclère, mon tuteur, pour sa patience, son aide et ses conseils. Merci de m'avoir fait partager tes nombreuses connaissances pratiques et théoriques tout au long de ces 10 mois. Mes remerciements s'adressent aussi à l'ensemble de l'équipe HIF pour leur sympathie et tout particulièrement à Marie pour ses connaissances à propos de la qRT-PCR, à Magali pour sa générosité et son aide et à Lionel Flamant pour ses nombreux prêts de tampon RIPA.

Un merci tout particulier à Eric Depierreux pour son aide dans les analyses statistiques des résultats présentés dans ce travail.

Je voudrais également remercier mes collègues de bureau, Thomas, Eliane, J-M, Elodie et Valérie pour la bonne ambiance et notre motivation mutuelle. Ces 10 mois n'auraient pas été les mêmes sans vous !

Je n'oublie pas tous les membres de l'URBC pour leur sympathie et leur accueil ! Merci à Edouard pour ses nombreux conseils !

Je remercie également mes parents, mes proches et mes amis pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix et supporté mes nombreuses sautes d'humeur tout au long de mon cursus universitaire.

Enfin, je tiens à remercier les membres du jury qui vont évaluer ce travail et leur souhaite une agréable lecture.

Je tiens à dédier ce mémoire à ma marraine, malheureusement décédée durant ces 10 mois de mémoire.

☐ Liste des abréviations ☐

ADN(c)	Acide désoxyribonucléique (complémentaire)
AIF	Apoptosis-inducing factor
AMPK	AMP-activated kinase
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor-1
ARN(m)	Acide ribonucléique (messenger)
ATF2	Activating transcription factor 2
Atg	Autophagy-related gene
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma
Becn1	Bécline 1
BH	Bcl-2 homology
BSA	Bovine serum albumin
CAM	Cell adhesion molecules
Caspase	Cystéinyl aspartate protéase
CMA	Autophagie médiée par les chaperones
CP (P)	Pectine de citrus
CRD	Carbohydrate recognition domain
Ct	Cycle threshold
CYLD	Lys-63-deubiquitylating enzyme cylindromatosis
DISC	Death-inducing signaling complex
E	Etoposide (contrôle positif)
EndoG	Endonucléase G
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ERM	Ezrin-radixin-moesin
FADD	Fas-associated via death domain
FasL	Fas ligand
FGF	Fibroblast growth factor
Flip	FLICE-like inhibitory protein
Gal-3	Galectine-3
GalA	Acide galacturonique
GLUD1	Glutamate déshydrogénase 1
GLUL	Glutamate-ammonia ligase
HA	Acide galacturonique
HIF	Hypoxia-inductible factor
HFCP (H)	Heat-fragmented citrus pectin
HG	Homogalacturonan
HNSCC	Carcinome cellulaire squameux tête et cou
Hsc70	Heat-shock cognate protein of 70 kDa
IARC	Agence Internationale pour la Recherche du Cancer
IAP	Inhibitor of apoptosis
IKK	IκB kinase
IκB	Inhibitor of kappa B
IL	Interleukine
IRF	Facteur régulateur de l'interféron
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAMP2	Lysosome-associated membrane protein type 2A

LDH	Lactate dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
M	Milieu (contrôle négatif)
MAP	Microtubule-associated protein
MAPK	Mitosis associated protein kinase
MCP	pH-modified citrus pectin
MD-2	Myeloid differentiation factor 88
MEC	Matrice extracellulaire
miRNAs	microRNAs
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MMP	Métalloprotéinase de matrice
MOMP	Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	Bromure de 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NK cells	Natural killer cells
PAMPs	Patterns moléculaires associés aux pathogènes
PARP	Poly ADP-ribose polymerase
PBS	Phosphate buffer saline
PE	Phosphatidyléthanolamine
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIB	Phosphatase inhibitor
PIC	Protease inhibitor
PPR	Pattern-recognition receptors
pRB	Protéine du rétinoblastome
PSA	Prostate specific antigen
PtdIns3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidene difluoride
PYGL	Glycogène phosphorylase
qRT-PCR	Quantitative retro-transcription polymerase chain reaction
Ras	Rat sarcoma
RE	Réticulum endoplasmique
RF	Risc Free (contrôle negative transfection)
RG-I	Rhamnogalacturonan-I
RG-II	Rhamnogalacturonan-II
RHAMM	Récepteur de motilité médié par l'hyaluronan (CD168)
RIP	Receptor-interacting protein
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodium dodécyl sulfate
siRNA	Small interfering RNA
Smac / DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP binding protein with low pI
SODD	Silencer of death domain
tBid	Bid tronqué
TGF- β	Transforming growth factor- β
TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
TLR-4	Toll-like receptor-4
TNF(R)	Tumor necrosis factor (receptor)

TRADD	TNFR1-associated death domain
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAM	TRIF-related adaptator molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β
TRAIL(R)	TNF-related apoptosis inducing factor (receptor)
ULK	Unc-151-like kinase
UVRAG	UV irradiation resistance associated tumor suppressor gene
VEGF	Vascular endothelium growth factor
XG	Xylogalacturonan

☒ Table des matières ☒

1. INTRODUCTION	1
1.1. LE CANCER.....	1
1.1.1. EPIDEMIOLOGIE DU CANCER	
1.1.2. DEFINITION DU CANCER	
1.1.3. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES ABOUTISSANT A UN CANCER	
a) L'auto-suffisance vis-à-vis des signaux de croissance	
b) L'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs	
c) L'échappement à la mort cellulaire programmée ou apoptose	
d) Le potentiel réplicatif illimité	
e) La capacité à stimuler l'angiogenèse	
f) L'invasion tissulaire et les métastases	
g) L'instabilité génomique	
h) L'inflammation	
i) La reprogrammation du métabolisme énergétique cellulaire	
j) L'échappement à l'attaque et à l'élimination par les cellules immunitaires	
1.1.4. LES DIVERS TRAITEMENTS	
1.2. LA MORT CELLULAIRE	7
1.2.1. MISE EN CONTEXTE	
1.2.2. L'AUTOPHAGIE	
a) Généralités	
b) L'autophagie médiée par les chaperones	
c) La microautophagie	
d) La macroautophagie	
1.2.3. L'APOPTOSE	
a) Généralités	
b) La voie intrinsèque	
c) La voie extrinsèque	
d) Convergence des deux voies	
1.2.4. LA NECROSE / LA NECROPTOSE	
a) Généralités	
b) La voie nécroptique	
1.3. LA PECTINE	14
1.3.1. GENERALITES	
1.3.2. STRUCTURE DE LA PECTINE	
1.3.3. LA PECTINE ET SA DIGESTION	
1.3.4. LA PECTINE ET SES EFFETS BENEFIQUES	
1.4. LES QUATRE RECEPTEURS CANDIDATS	17
1.4.1. MISE EN CONTEXTE	
1.4.2. LA GALECTINE-3	
1.4.3. LE RECEPTEUR CD44	
1.4.4. LE RECEPTEUR CD168	
1.4.5. LE RECEPTEUR TLR-4	
2. OBJECTIFS DU MEMOIRE.....	23

3. MATERIEL ET METHODES.....24

3.1. FRAGMENTATION DE LA PECTINE DE CITRUS	24
3.1.1. MATERIEL	
3.1.2. METHODES	
3.2. CULTURE CELLULAIRE	24
3.2.1. MATERIEL	
3.2.2. METHODES	
3.3. ENSEMENCEMENT CELLULAIRE	25
3.3.1. PRINCIPE	
3.3.2. MATERIEL	
3.3.3. METHODE	
3.4. INCUBATION CELLULAIRE	26
3.4.1. MATERIEL	
3.4.2. METHODE	
3.5. EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE : MESURE DU RELARGAGE DE LA LDH	26
3.5.1. PRINCIPE	
3.5.2. MATERIEL	
3.5.3. METHODE	
3.6. MESURE DE VIABILITE CELLULAIRE GRACE AU MTT	28
3.6.1. PRINCIPE	
3.6.2. MATERIEL	
3.6.3. METHODE	
3.7. WESTERN BLOT.....	28
3.7.1. PRINCIPE	
3.7.2. MATERIEL	
3.7.3. METHODE	
a) Extraction de protéines totales	
b) Dosage de la concentration en protéines avec le réactif de Pierce	
c) Préparation des échantillons	
d) Migration	
e) Transfert semi-sec	
f) Traitement de la membrane et révélation	
3.8. MARQUAGE EN IMMUNOFLUORESCENCE	31
3.8.1. PRINCIPE	
3.8.2. MATERIEL	
3.8.2. METHODE	
3.9. TRANSFECTION DE SIRNAS	32
3.9.1. PRINCIPE	
3.9.2. MATERIEL	
3.9.3. METHODE	
3.10. PCR EN TEMPS REEL.....	32
3.10.1. PRINCIPE	
3.10.2. MATERIEL	
3.10.3. METHODE	
a) Extraction d'ARN total	
b) Dosage de la concentration en ARN	
c) Transcription inverse	
d) PCR en temps réel	
e) Analyse des résultats	

3.11. ANALYSE STATISTIQUE	34
<u>4. RESULTATS.....</u>	35
4.1. ETUDE DE L'EFFET CYTOTOXIQUE DE LA PECTINE FRAGMENTEE.....	35
4.2. DETERMINATION DU TYPE DE MORT CELLULAIRE INDUIT PAR LA PECTINE FRAGMENTEE	36
4.2.1. ETUDE DE L'APOPTOSE	
4.2.2. ETUDE DE L'AUTOPHAGIE	
a) La bafilomycine	
b) La 3-méthyladénine	
4.2.3. ETUDE DE LA NECROPTOSE	
4.3. DETERMINATION DU(ES) RECEPTEUR(S) IMPLIQUE(S) DANS LA RECONNAISSANCE DES FRAGMENTS PECTIQUES.....	41
4.3.1. ETUDE DE L'EXPRESSION EN ARNm ET PROTEIQUE DES QUATRE RECEPTEURS CIBLES DANS LES CELLULES CANCEREUSES A549 ET HEPG2	
a) Expression en ARNm	
b) Expression protéique	
4.3.2. ETUDE DE L'INHIBITION DE L'EXPRESSION DES TROIS RECEPTEURS CANDIDATS DANS LES CELLULES CANCEREUSES A549 ET HEPG2	
4.3.3. ETUDE DE LA CYTOTOXICITE CELLULAIRE INDUITE PAR LES FRAGMENTS PECTIQUES DANS LES CELLULES A549 ET HEPG2 EN PRESENCE DE siRNAs CIBLANT LA GALECTINE-3, LE CD44 ET LE CD168	
<u>5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	49
5.1. CARACTERISATION DU TYPE DE MORT CELLULAIRE INDUIT.....	50
5.2. CARACTERISATION DU(ES) RECEPTEUR(S) IMPLIQUE(S) DANS LA RECONNAISSANCE DES FRAGMENTS PECTIQUES.....	54
<u>6. BIBLIOGRAPHIE.....</u>	58

Introduction

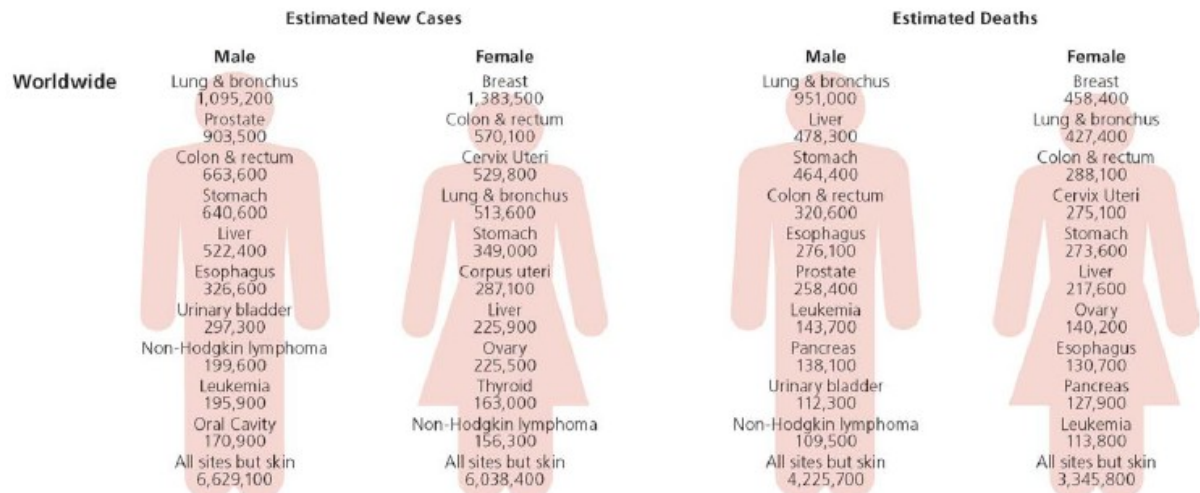


Figure 1.1 : Nombre de nouveaux cas de cancer estimés et nombre de décès dus au cancer estimés à travers le Monde. Les cancers les plus fréquents chez les hommes sont ceux des poumons et de la prostate et les meurtriers, ceux des poumons et du foie. Chez les femmes, le cancer le plus fréquent et le plus meurtrier est celui du sein. Ces chiffres datent de 2008 (Jemal et al., 2011).

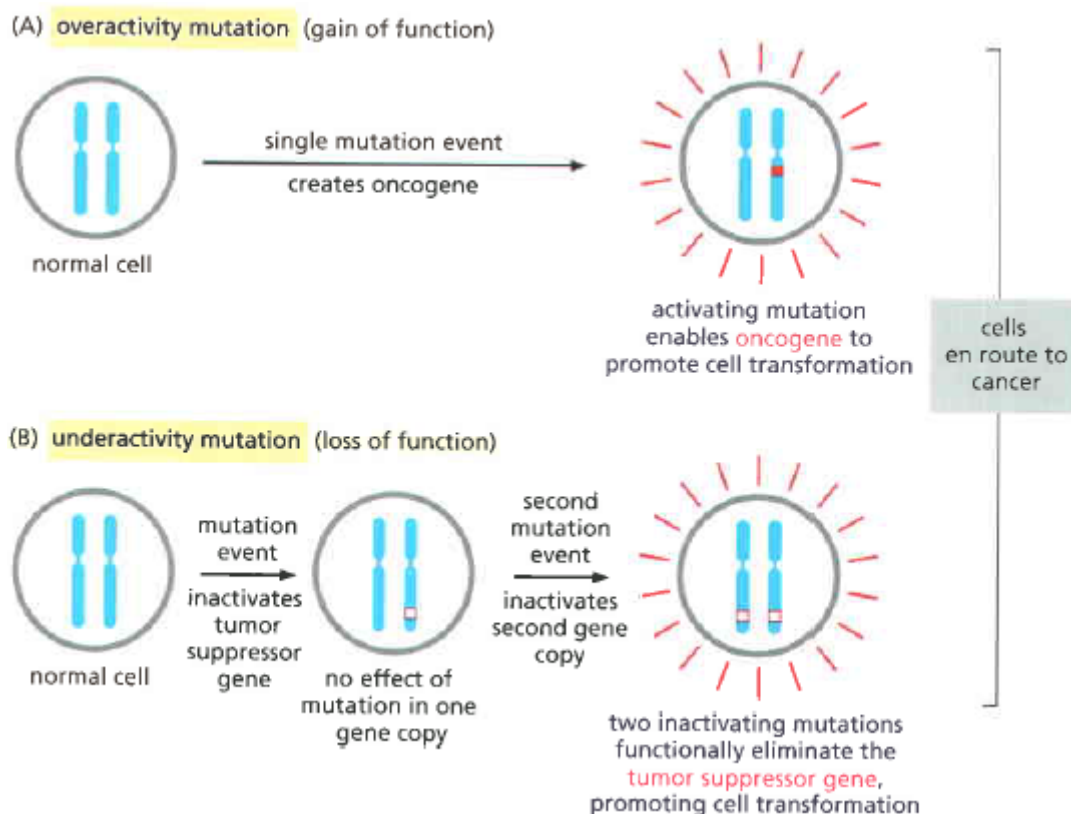


Figure 1.2 : Les mutations conduisant au cancer se divisent en deux catégories distinctes, dominantes et récessives. (A) Lorsqu'un pro-oncogène est sujet à une mutation dans une copie unique du gène, il devient un oncogène. Ce dernier permet la transformation cellulaire, c'est donc une mutation gain de fonction. **(B)** Lorsqu'un gène suppresseur de tumeur est sujet à une mutation dans une copie unique du gène, la transformation cellulaire n'a pas lieu. Elle a lieu quand les deux copies du gène sont mutées, inactivant le gène suppresseur de tumeur, c'est une mutation perte de fonction (Alberts et al., 2008).

1. Introduction

1.1. Le cancer

1.1.1. Épidémiologie du cancer

Depuis de nombreuses années, le cancer est devenu la principale cause de mortalité dans les régions développées, faisant de lui, à l'heure actuelle, un problème majeur de santé publique. Selon les chiffres de l'Agence Internationale pour la Recherche du Cancer (IARC), au moins une personne sur trois développera un cancer au cours de sa vie et une personne sur quatre pour les hommes (une personne sur cinq pour les femmes) décèdera des suites d'un cancer. En 2008, 12,7 millions de diagnostics et 7,6 millions de décès ont été répertoriés à travers le Monde (**Figure 1.1**) (Jemal et al., 2011, Ferlay et al., 2010). Ces chiffres vont croître encore d'ici quelques années dû au vieillissement de la population et à l'adoption de multiples comportements favorisant l'apparition de cancers tels la cigarette, l'inactivité physique, ou/et l'alimentation « occidentalisée » (Jemal et al., 2011, Kushi et al., 2006, Ferlay et al., 2010). L'incidence (nombre de nouveaux cas diagnostiqués chaque année) et le taux de mortalité (nombre de décès par 100000 personnes par an) sont différents pour chaque type de cancer. De plus, l'incidence varie en fonction du sexe et augmente avec l'âge. Par exemple, le cancer le plus diagnostiqué et le plus mortel chez les femmes est celui du sein tandis que chez les hommes, le plus diagnostiqué est celui du poumon mais le plus meurtrier est celui de la prostate (**Figure 1.1**). Le cancer du foie occupe, lui aussi, les premières marches du podium (Jemal et al., 2011, Ferlay et al., 2010). Ces chiffres sont affolants à l'aube du 21^{ème} siècle. C'est pourquoi la prévention et le contrôle sont des enjeux sanitaires importants. De plus, la recherche en cancérologie est en pleine expansion : une grande quantité de connaissances à propos du mécanisme tumoral a été acquise ces dernières années, et ce, en peu de temps grâce au progrès technologique.

1.1.2. Définition du cancer

Le cancer est une pathologie caractérisée par une multiplication anarchique de cellules possédant des modifications génétiques telles que des mutations gain de fonction, des réarrangements chromosomiques ou des amplifications dans les oncogènes, ce qui les activent, ainsi que des mutations perte de fonction dans les gènes suppresseurs de tumeur, ce qui les inactivent. Les oncogènes codent pour des protéines régulant la prolifération cellulaire, l'apoptose, ou les deux (facteurs de transcription, remodeleurs de chromatine, facteurs de croissance et leurs récepteurs, transducteurs de signal et régulateurs d'apoptose), tandis que les gènes suppresseurs de tumeur empêchent la transformation cellulaire en temps normal, via des protéines surveillant l'ADN par exemple. Ainsi, la diminution de fonction des gènes suppresseurs de tumeur favorise l'apparition de mutations et la transformation cellulaire tandis que l'augmentation d'expression des oncogènes confère à la cellule cancéreuse un avantage de croissance ou une augmentation de survie (**Figure 1.2**) (Croce, 2008). Cependant, il a été récemment montré que le cancer pouvait également résulter d'altérations dans les gènes codant pour des microRNAs. Les miRNAs sont des ARNs simple brin de 21 à 23 nucléotides dont la fonction est de réguler l'expression génique en inhibant l'ARNm de protéines cibles, bloquant la traduction en protéine ou dégradant l'ARNm. Certains d'entre eux sont surexprimés par exemple, par amplification et agissent comme un oncogène qui diminue l'expression de gènes suppresseurs de tumeur, tandis que ceux dont l'expression est diminuée par exemple par délétion agissent comme des gènes suppresseurs de tumeur qui diminuent l'expression d'oncogènes (**Figure 1.3**) (Caldas et Brenton, 2005, Croce, 2008,

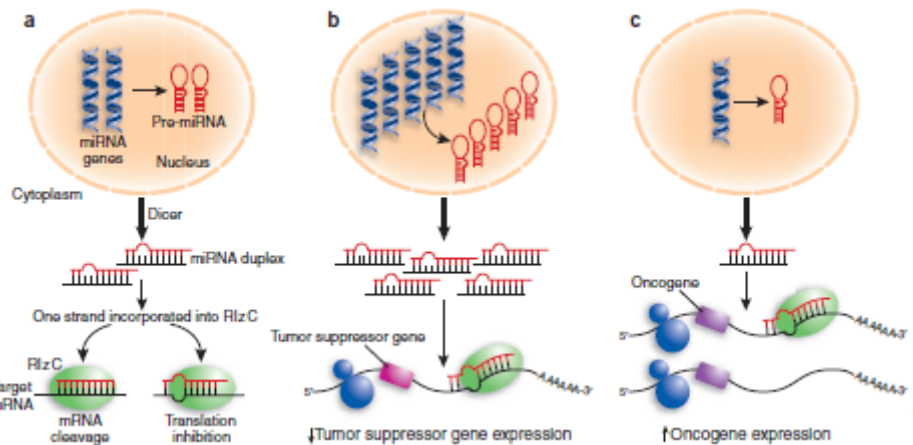


Figure 1.3 : Modèle d'implication des miRNAs dans le cancer en modulant l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes. (A) Les pri-miRNAs sont transformés dans le noyau en pré-miRNAs qui sont exportés vers le cytoplasme pour ensuite, être pris en charge par l'enzyme Dicer pour donner des miRNAs. Ces miRNAs clivent des ARNm cibles ou inhibent leur traduction grâce à RISC (RNA-induced silencing complex). (B) La surexpression de miRNAs diminue l'expression des gènes suppresseur de tumeur cibles. (C) La diminution d'expression de miRNAs augmente l'expression des oncogènes cibles (Caldas & Brenton, 2005).

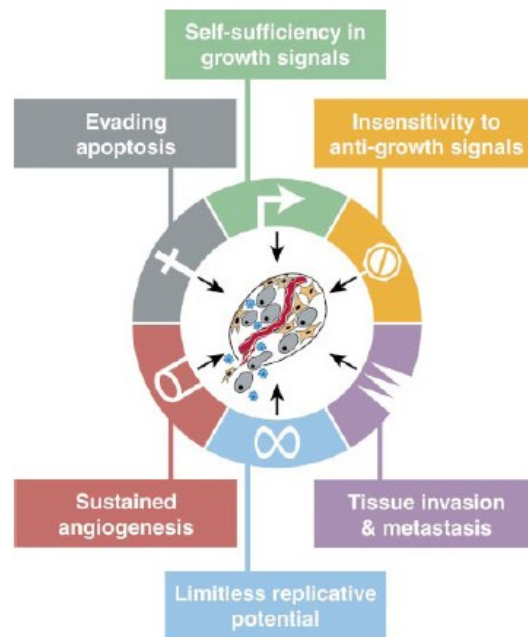


Figure 1.4 : Les différents Hallmarks caractéristiques d'un cancer. L'auto-suffisance vis-à-vis des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, l'échappement à la mort cellulaire programmée ou l'apoptose, le potentiel réplcatif illimité, la capacité à stimuler l'angiogenèse et l'invasion tissulaire et les métastases représentent les modifications nécessaires aux cellules normales pour se transformer en cellules cancéreuses (Hanahan et Weinberg, 2000).

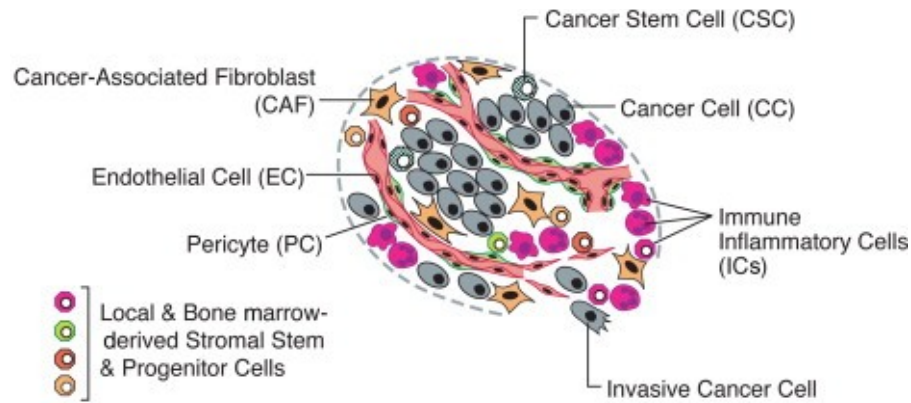


Figure 1.5 : Les cellules du microenvironnement de la tumeur. Les cellules avoisinantes tels les fibroblastes jouent un rôle dans la prolifération cellulaire tumorale en produisant des facteurs paracrines (signaux des cellules voisines) ou endocrines (signaux systémiques), comme c'est le cas pour les cellules normales (Hanahan et Weinberg, 2011).

Palmero et al., 2011). Ainsi, la tumorigenèse est le résultat d'un processus multistep d'altérations génétiques qui transforment progressivement une cellule humaine normale en cellule tumorale en lui procurant un avantage de croissance et en perturbant son homéostasie (Croce, 2008). Ces altérations génétiques peuvent apparaître suite à l'exposition à des carcinogènes (tabac, amiante, etc) ou à des rayonnements (UV, rayons X, etc), et suite à l'infection par des virus tels que le virus des hépatites B et C. Il a également été montré que le cancer pouvait avoir une origine héréditaire et que l'âge jouait un rôle important. En effet, avec l'âge, par exemple, la capacité à réparer l'ADN est diminuée ce qui augmente le nombre de mutations (Ferlay et al., 2010, Jemal et al., 2011).

Par ailleurs, les tumeurs incluent différents clones, qui dérivent tous de la cellule transformée initiale, à travers des altérations génétiques secondaire ou tertiaire. Cette hétérogénéité est responsable des différences observées dans le comportement clinique et les réponses des tumeurs au traitement. Lorsque ces cellules transformées se divisent, elles génèrent une tumeur primaire qui peut former à son tour des tumeurs secondaires ou métastases et envahir ainsi, un ou plusieurs sites distants (Croce, 2008). Bien qu'une grande quantité de connaissances quant au mécanisme de la transformation cancéreuse a pu être engendrée ces dernières années, le cancer reste une des causes principales de décès, c'est pourquoi le développement de nouveaux traitements toujours plus efficaces est nécessaire afin d'éradiquer cette maladie mortelle.

1.1.3. Principales caractéristiques aboutissant à un cancer

En 2000, Hanahan et Weinberg suggérèrent que les cellules tumorales résultaient d'une manifestation de six altérations essentielles qui, ensemble, dictent la croissance tumorale : l'auto-suffisance vis-à-vis des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, l'échappement à la mort cellulaire programmée ou l'apoptose, le potentiel réplicatif illimité, la capacité à stimuler l'angiogenèse et l'invasion tissulaire et les métastases. Chacun de ces changements physiologiques acquis durant le développement du cancer représente une rupture dans le mécanisme de défense anti-tumoral (**Figure 1.4**) (Hanahan et Weinberg, 2000). Ces altérations sont détaillées ci-dessous.

a) L'auto-suffisance vis-à-vis des signaux de croissance

Les cellules normales ont besoin de signaux mitogéniques pour pouvoir proliférer. Ces signaux sont transmis dans la cellule par des récepteurs transmembranaires qui lient différentes classes de molécules telles que des facteurs de croissance diffusibles, des composés de la matrice extracellulaire (MEC) et des molécules d'adhérence cellule-cellule. Aucune cellule normale ne prolifère en absence de ces signaux, contrairement aux cellules cancéreuses dont la dépendance aux signaux de croissance exogènes est diminuée. Les cellules tumorales produisent donc elles-mêmes leurs propres signaux auxquels elles répondent et créent une boucle de feedback positif (stimulation autocrine). Pour permettre l'autonomie, trois stratégies moléculaires sont possibles : altérations des signaux de croissance extracellulaires, des transducteurs transcellulaires ou des circuits intracellulaires.

Cependant, il est difficile d'expliquer tout le cancer seulement avec ce point, les cellules avoisinantes telles que les fibroblastes ont probablement aussi un rôle à jouer dans la prolifération cellulaire tumorale via la sécrétion de facteurs paracrines (signaux des cellules voisines) ou endocrines (signaux systémiques), comme c'est le cas pour les cellules normales. Ainsi, les tumeurs recrutent des cellules stromales non tumorales afin de créer le « microenvironnement tumoral » ou le stroma associé à la tumeur qui favorise leur croissance (**Figure 1.5**) (Hanahan et Weinberg, 2000).

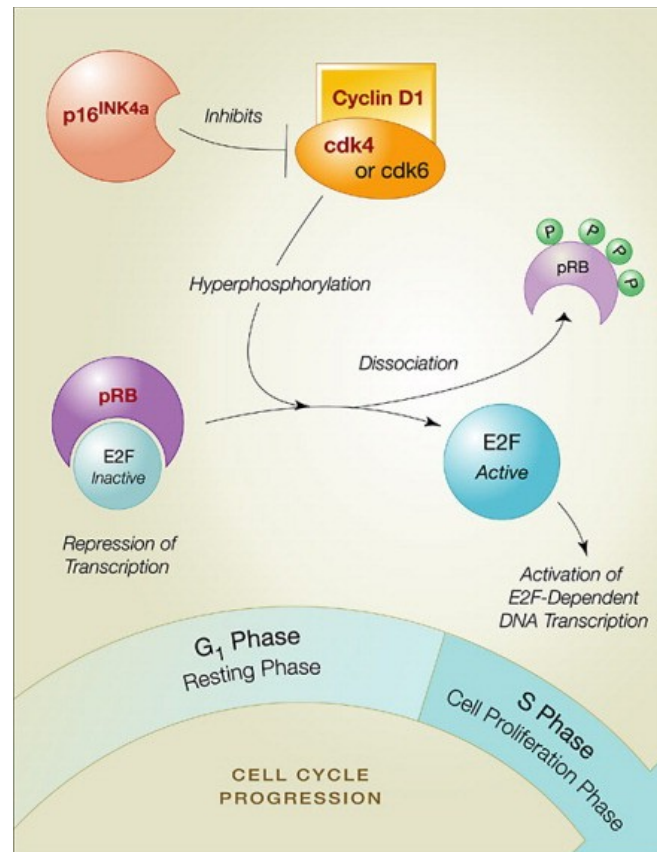


Figure 1.6 : La protéine pRb. Les signaux anti-prolifératifs sont pris en charge par la protéine pRb. Elle séquestre le facteur de transcription E2F qui contrôle l'expression de gènes essentiels pour la progression de la phase G₁ vers la phase S. Pour se faire, elle doit être hypophosphorylée. Lorsqu'elle est hyperphosphorylée (par les complexes cycline-CDK), elle libère E2F qui permet la prolifération cellulaire, rendant alors les cellules insensibles aux facteurs anti-prolifératifs (Livingston et Shivdasani, 2001).

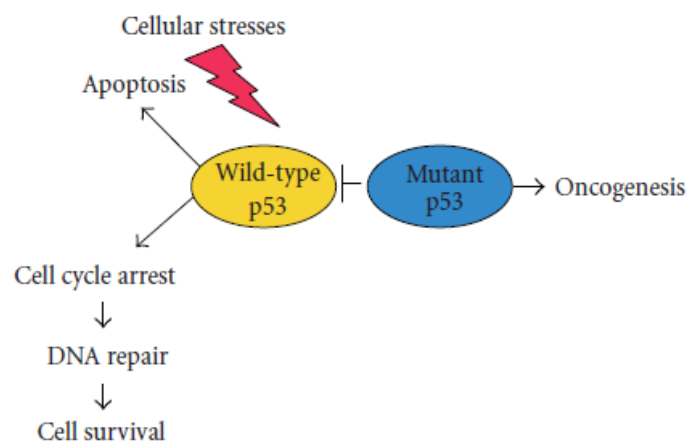


Figure 1.7 : Rôle du suppresseur de tumeur p53. p53 est impliqué dans la transcription génique, la synthèse et la réparation de l'ADN, la sénescence, la plasticité génomique et l'apoptose. Il est le « gardien du génome ». Lors d'un stress cellulaire, soit, il induit l'apoptose, soit il arrête le cycle cellulaire, induit la réparation de l'ADN et promeut la survie cellulaire. Si p53 est muté, cela favorise l'oncogénèse (Ozaki et Nakagawara, 2010).

b) L'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs

Dans un tissu normal, de nombreux signaux anti-prolifératifs opèrent afin de maintenir la quiescence cellulaire et l'homéostasie tissulaire. Ces signaux incluent des inhibiteurs de croissance solubles et des inhibiteurs situés dans la MEC et à la surface des cellules voisines, et sont perçus par des récepteurs transmembranaires situés à la surface cellulaire afin d'agir sur les circuits intracellulaires. Ainsi, les cellules cancéreuses doivent éviter ces signaux anti-prolifératifs afin de former une masse tumorale. Beaucoup et peut-être tous les signaux anti-prolifératifs sont pris en charge par la voie de la protéine du rétinoblastome (pRb), qui peut aussi être altérée dans les cellules tumorales. Cette protéine intègre les signaux de diverses sources extra- et intracellulaires et décide si oui ou non une cellule peut se diviser. Dans un état hypophosphorylé, pRb bloque la prolifération cellulaire en séquestrant et en altérant la fonction du facteur de transcription E2F qui contrôle l'expression de gènes essentiels pour la progression de la phase G1 vers la phase S. Par contre, quand pRb est hyperphosphorylé, E2F est libéré et permet la prolifération cellulaire, rendant les cellules insensibles aux facteurs anti-prolifératifs qui normalement agissent au niveau de cette voie. pRb est donc considéré comme un gène suppresseur de tumeur (**Figure 1.6**) (Livingston et Shivdasani, 2001, Hanahan et Weinberg, 2000).

c) L'échappement à la mort cellulaire programmée ou l'apoptose

Les cellules normales accumulant des mutations sont généralement éliminées via le mécanisme de mort cellulaire programmée ou apoptose (voir point 1.2.2). Cependant, les cellules tumorales sont souvent capables d'y échapper pour survivre et proliférer. Ainsi, certaines stratégies se mettent en place telles qu'une augmentation d'expression ou une suractivation de protéines anti-apoptotiques ou une diminution d'expression des protéines pro-apoptotiques ou une mutation dans le gène qui les encode. C'est le cas par exemple, d'une translocation chromosomique permettant la surexpression de Bcl-2 (B-cell lymphoma), une protéine anti-apoptotique. La résistance à l'apoptose peut également être acquise par l'inactivation de p53, un suppresseur de tumeurs, considéré comme le gardien du génome en reconnaissant les dommages à l'ADN et en activant la machinerie de réparation. p53 est également capable d'induire l'apoptose des cellules endommagées. Cette inactivation de la protéine se fait via des mutations dans son gène. Cette inactivation est observée dans plus de 50 % des cancers humains (**Figure 1.7**). De ce fait, les tumeurs croissent plus rapidement et contiennent un faible nombre de cellules apoptotiques (Adams et Cory, 2007, Jin et El-Deiry, 2005, Hanahan et Weinberg, 2000, Ozaki et Nakagawara, 2010).

d) Le potentiel réplicatif illimité

Dans les cellules mammaliennes normales, il existe un programme autonome de la cellule qui limite leur multiplication. Cet arrêt de réplication est notamment dû à un raccourcissement des télomères. Les télomères sont des structures présentes à l'extrémité des chromosomes eucaryotes qui sont essentielles pour la stabilité génomique. Elles sont composées de quelques milliers de répétitions de séquences double brin de six pb et d'une courte extrémité simple brin en 3'. A chaque cycle cellulaire, une perte de 50 à 100 pb d'ADN télomérique est observée car l'ADN polymérase est incapable de répliquer complètement l'extrémité 3' des chromosomes. Ainsi, ce raccourcissement progressif engendre une perte de la protection des extrémités chromosomiques, jusqu'à atteindre une longueur seuil. C'est à ce moment que la sénescence est initiée stoppant la division cellulaire. La télomérase, dont l'activité est faible ou absente dans les cellules normales, est surexprimée (réactivée) dans les cellules cancéreuses et ajoute ainsi des répétitions d'hexanucléotides au niveau des extrémités télomériques. Cette réactivation de la télomérase est trouvée dans 90% des cancers. Les cellules cancéreuses n'ont donc plus la barrière de mortalité et prolifèrent de manière illimitée

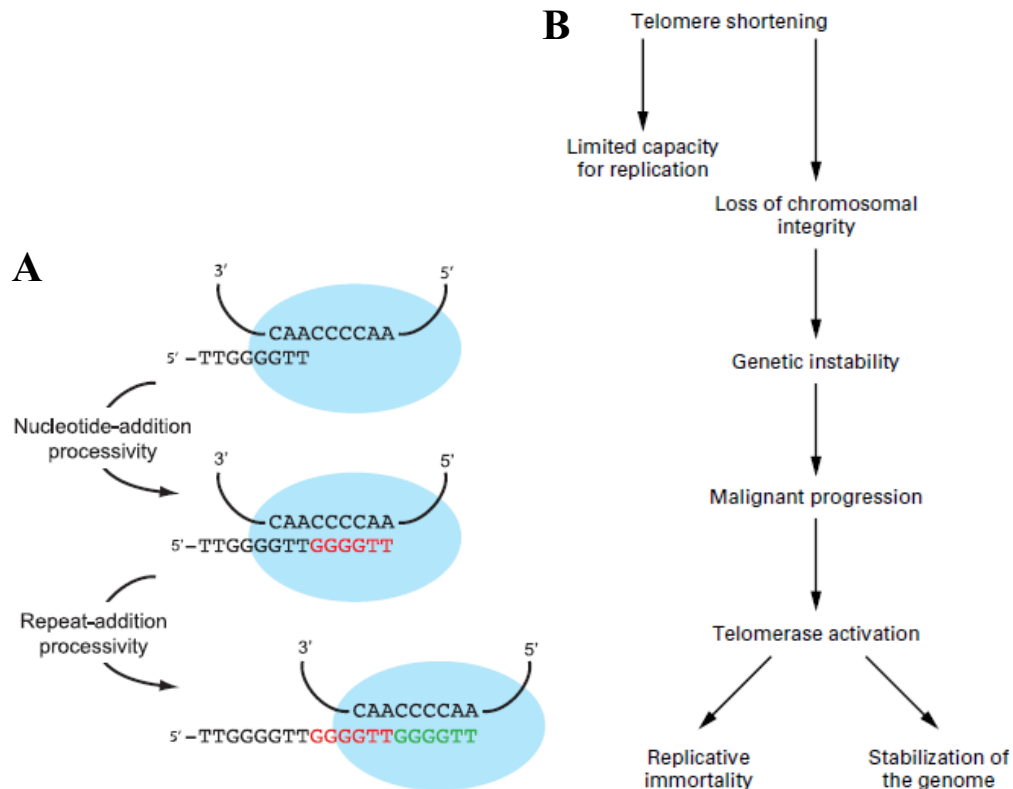


Figure 1.8 : L'action de la télomérase. (A) La télomérase est une enzyme qui ajoute des répétitions d'hexanucléotides au niveau des extrémités télomériques riches en C et en A (Osterhage et Friedman, 2009). (B) Dans la plupart des cancers, elle est réactivée ce qui permet une immortalité répliquative et une stabilisation du génome (en particulier les extrémités chromosomiques) (Hahn et Weinberg, 2002).

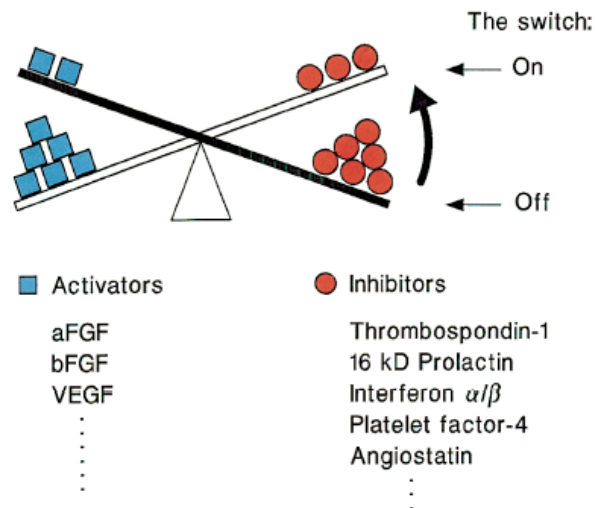


Figure 1.9 : Le switch angiogénique. Il existe une balance entre les inhibiteurs et les activateurs de l'angiogenèse. Pour permettre ce processus, la balance doit pencher vers les activateurs, c'est la position on, contrairement à la position off qui fait pencher la balance du côté des inhibiteurs bloquant ainsi l'angiogenèse (Hanahan et Folkman, 1996).

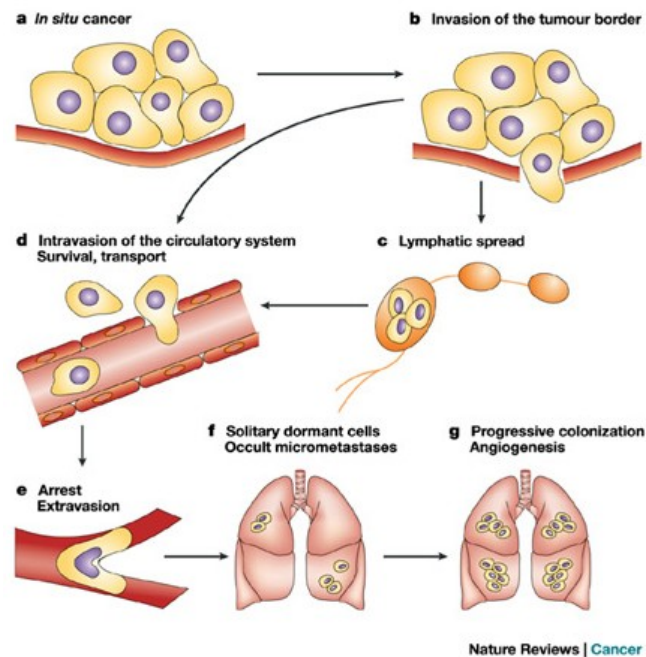


Figure 1.10 : La mise en place des métastases. (A) Aux premiers stades du cancer, les cellules cancéreuses sont entourées par une membrane basale intacte. (B) L'invasion requiert des changements dans l'adhérence cellules-cellules et cellules-MEC. La destruction de protéines de la matrice et la motilité se mettent également en place. (C) Les cellules métastatiques entrent dans les vaisseaux lymphatiques (D) ou peuvent directement entrer dans la circulation sanguine. (E) Les cellules tumorales s'arrêtent dans de petits capillaires et s'extravasent. (F) La colonisation métastatique vers les sites distants progresse via une cellule unique qui peut rester dormante pendant plusieurs années. (G) Les cellules des métastases se multiplient et envahissent complètement le tissu environnant (Steeg, 2003).

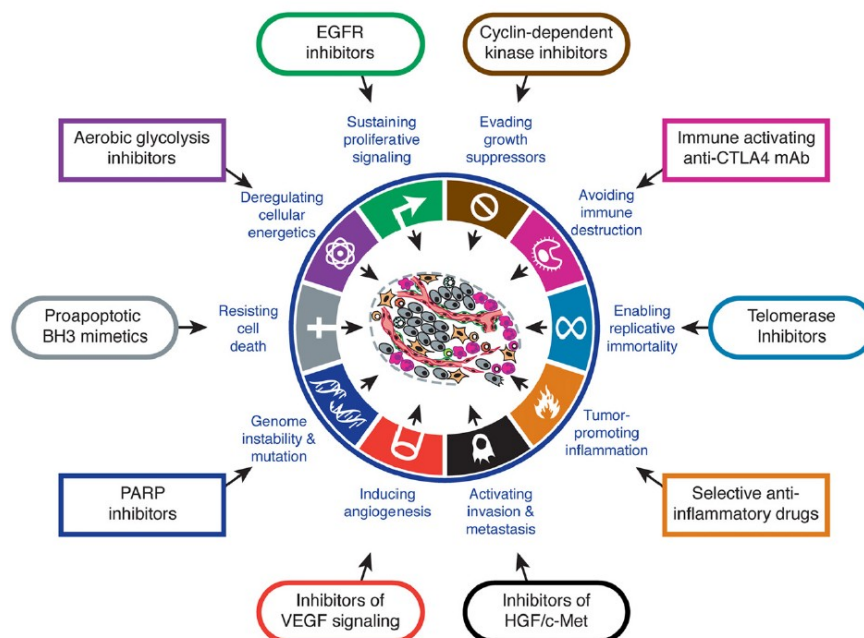


Figure 1.11 : Les Hallmarks supplémentaires caractéristiques d'un cancer. En 2011, quatre nouveaux Hallmarks ont fait leur apparition : l'instabilité génomique, l'inflammation, la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire. Il est donc intéressant de mettre au point de nouveaux traitements ciblant ces différents Hallmarks, nous en montrons quelques-uns, interférant avec ces nouvelles capacités acquises par les cellules (Hanahan et Weinberg, 2011).

(Figure 1.8) (Hahn et Weinberg, 2002, Hanahan et Weinberg, 2000, Osterhage et Friedman, 2009).

e) La capacité à stimuler l'angiogenèse

L'oxygène et les nutriments apportés par le réseau vasculaire sont cruciaux pour la survie et la fonction cellulaires, obligeant toute cellule du corps à se trouver à moins de 100 µm d'un vaisseau sanguin. Ainsi, lors de l'embryogenèse ou d'une cicatrisation, l'angiogenèse, phénomène extrêmement régulé, se met en place. Elle correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux sanguins pré-existants. Ce phénomène apparaît également de manière pathologique dans la tumeur. Il résulte d'un déséquilibre dans la balance entre les facteurs pro- et antiangiogéniques **(Figure 1.9)**. Ainsi, une surexpression des gènes des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF (vascular endothelium growth factor), via le facteur de transcription HIF (hypoxia-inductible factor) activé en condition hypoxique, régule positivement l'angiogenèse. De même, une diminution d'expression de facteurs antiangiogéniques, tels que les intégrines, permet également d'activer l'angiogenèse. Cette dernière contribue alors à la croissance tumorale, l'invasion et les métastases (Hanahan et Folkman, 1996, Hanahan et Weinberg, 2000).

f) L'invasion tissulaire et les métastases

Selon le type de cancer, les masses tumorales primaires envahissent tôt ou tard les tissus adjacents. Certaines cellules de ces tumeurs peuvent pénétrer dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et ressortir du flux sanguin ou lymphatique afin de coloniser un nouveau site et d'établir une nouvelle colonie, c'est la métastase. Il semblerait que des changements dans l'adhérence des cellules et la sécrétion de protéases extracellulaires jouent des rôles importants dans ce processus. Ces tumeurs secondaires s'observent essentiellement au niveau des os, des poumons, de la prostate, des reins, du foie, de la thyroïde et du cerveau et sont responsables de 90% de la mortalité due au cancer, ce qui explique pourquoi leur apparition est associée à un très mauvais pronostic de survie **(Figure 1.10)** (Hanahan et Weinberg, 2000).

Suite aux découvertes réalisées depuis leur premier article paru en 2000, Hanahan et Weinberg ont proposé, en 2011, quatre nouveaux hallmarks caractérisant les tumeurs. Ce sont l'instabilité génomique, l'inflammation, la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire **(Figure 1.11)** (Hanahan et Weinberg, 2011).

g) L'instabilité génomique

L'acquisition des hallmarks cités ci-dessus dépend en grosse partie d'une succession d'altérations dans le génome des cellules tumorales. En effet, certains génotypes mutants génèrent un avantage sélectif à ces clones cellulaires. Dans les cellules normales, les systèmes de maintenance détectent et résolvent les défauts de l'ADN garantissant un taux de mutations très faible. Ces systèmes forcent aussi les cellules endommagées à enclencher la sénescence ou l'apoptose. Cependant, dans les cellules cancéreuses, ce taux de mutations augmente fortement car la machine de maintenance génomique ne fonctionne plus correctement. C'est le cas, par exemple, de p53, mentionné ci-dessus. Sa fonction est perdue au cours de la progression tumorale par des mutations inactivantes ou via une répression épigénétique. Une autre instabilité génomique touche aussi la télomérase, également citée ci-dessus.

Ces altérations génomiques varient selon les différents types de tumeurs mais se trouvent dans la grande majorité des cellules cancéreuses. Ainsi, les défauts dans les gènes de maintenance et de la réparation sont sélectivement avantageux pour la tumeur car ils accélèrent la vitesse à laquelle les cellules pré-malignes accumulent des altérations génomiques favorables. Il est important de noter qu'un seul changement génétique est

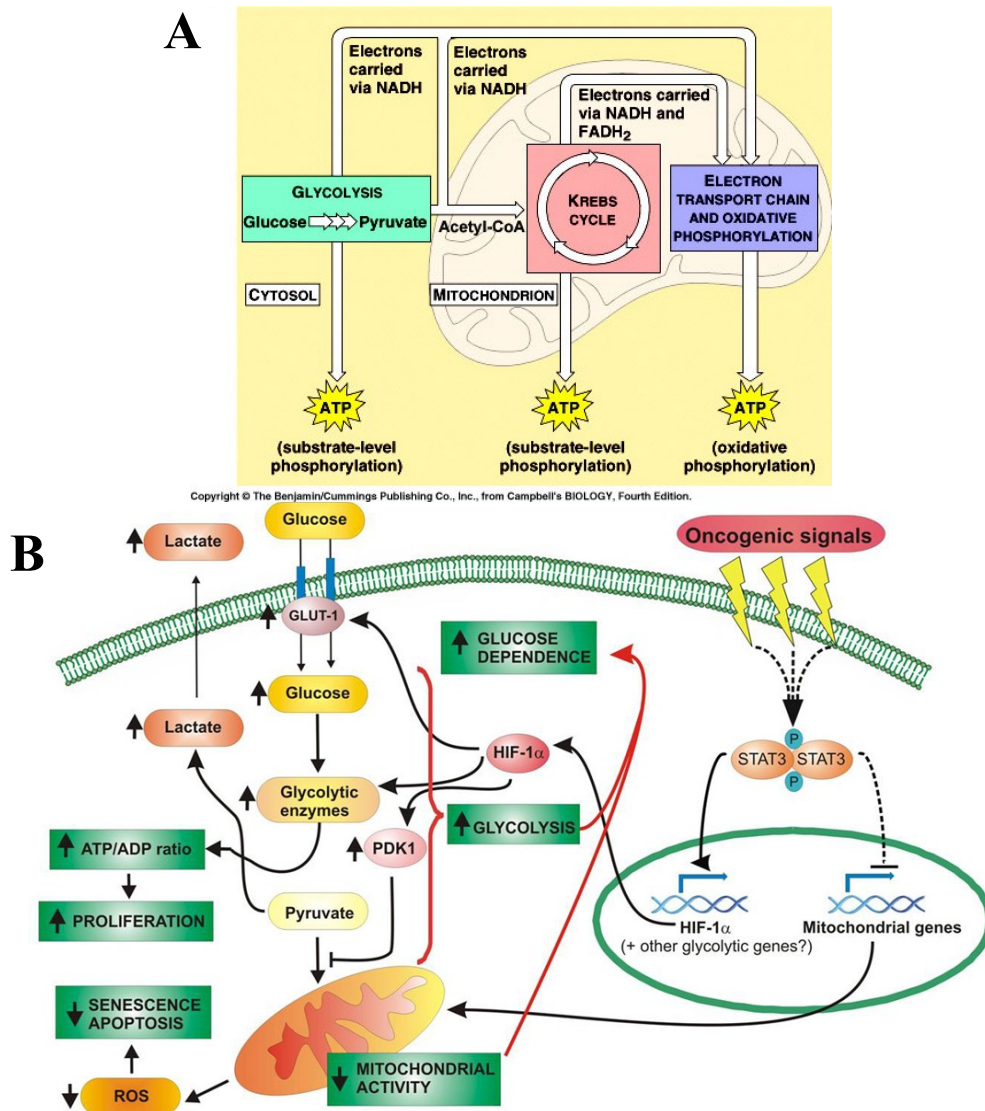


Figure 1.12 : La reprogrammation du métabolisme énergétique cellulaire, un hallmark favorisant le développement des cancers. (A) Dans les cellules normales, le glucose est transformé en pyruvate dans le cytosol grâce à la glycolyse. Ce mécanisme fournit 2 molécules d'ATP. Le pyruvate entre dans la mitochondrie, subit le cycle de Krebs qui fournit 2 molécules d'ATP et les électrons récupérés passent dans la chaîne des phosphorylations oxydatives qui fournit 32 molécules d'ATP (Campbell et al., 2007). **(B)** Les signaux oncogéniques activent HIF-1 et diminuent l'expression de certaines protéines mitochondriales. HIF-1 induit la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la glycolyse (GLUT-1, PDK-1,...), ce qui augmente la production de lactate mais également le ratio ATP/ADP qui augmente la prolifération cellulaire. Suite à la diminution d'expression de protéines mitochondriales, l'activité de la mitochondrie diminue, menant à la diminution de la production de ROS, protégeant les cellules de la sénescence et de l'apoptose. Ainsi, le switch métabolique des phosphorylations oxydatives vers la glycolyse aérobie rend les cellules cancéreuses très sensibles à la privation de glucose (Demaria et al., 2010).

rarement suffisant pour le développement d'une tumeur maligne, c'est surtout un processus multistep séquentiel d'altérations dans de nombreux gènes, qui est à la base de la transformation maligne (Hahn et Weinberg, 2002, Hanahan et Weinberg, 2011).

h) L'inflammation

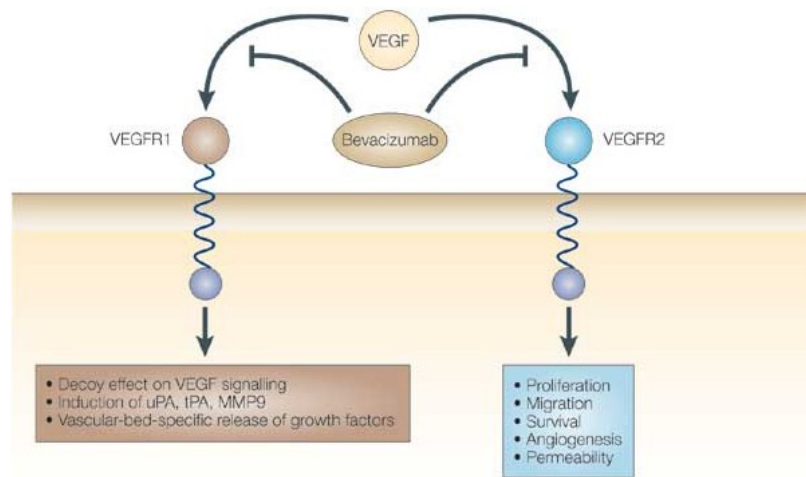
Depuis de nombreuses années, les pathologistes ont remarqué que les tumeurs étaient infiltrées par des cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Cependant, leur densité varie de l'infiltration subtile à la grosse inflammation. Ainsi, le système immunitaire tente d'éradiquer les tumeurs mais les cellules tumorales échappent à la destruction immunitaire (voir point j). Par ailleurs, l'inflammation permet d'augmenter la tumorigenèse et la progression tumorale. En effet, l'inflammation peut approvisionner le microenvironnement tumoral en molécules bioactives telles que les facteurs de croissance, les facteurs de survie ou encore les facteurs proangiogéniques mais aussi des substances chimiques comme des ROS (reactive oxygen species) qui sont mutagènes pour les cellules tumorales, accélérant ainsi leur évolution génétique vers des stades plus malins. Souvent, cette inflammation est présente dès les premiers stades de la transformation tumorale (Hanahan et Weinberg, 2011, Mantovani, 2009, Porta et al., 2009, Colotta et al., 2009).

i) La reprogrammation du métabolisme énergétique cellulaire

En condition aérobie, les cellules normales transforment le glucose en pyruvate via la glycolyse dans le cytosol et puis en dioxyde de carbone dans la mitochondrie afin de fournir de l'énergie (ATP) via les phosphorylations oxydatives (**Figure 1.12A**). Cependant, le microenvironnement tumoral est caractérisé par une microvascularisation désorganisée et par la présence de zones hypoxiques (quantité d'oxygène apportée aux cellules cancéreuses du centre de la tumeur diminuée), forçant les cellules tumorales centrales à s'adapter en favorisant la glycolyse par rapport aux phosphorylations oxydatives, l'oxygène n'étant plus disponible pour effectuer la respiration aérobie. Ainsi, les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme énergétique en se limitant qu'à la glycolyse, c'est la « glycolyse aérobie », afin d'entretenir la croissance et la division cellulaire. Ce switch métabolique est possible suite à l'hypoxie ou aux mutations dans les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs qui augmentent l'expression du facteur de transcription HIF qui, à son tour, surexprime les transporteurs de glucose et les diverses enzymes de la voie glycolytique - et donc la glycolyse - afin de compenser la moindre efficacité de la glycolyse par rapport à la phosphorylation oxydative mitochondriale (18 fois moins d'ATP produit). Ainsi, les cellules cancéreuses hypoxiques produisent l'ATP nécessaire à leur croissance et leur division, indépendamment de l'oxygène (**Figure 1.12B**) (Hanahan et Weinberg, 2011, Levine et Puzio-Kuter, 2010, Yeung et al., 2008, Kroemer et Pouyssegur, 2008).

j) L'échappement à l'attaque et à l'élimination par les cellules immunitaires

Les cellules et les tissus sont constamment contrôlés par le système immunitaire. Ce système immunitaire est également responsable de la reconnaissance et de l'élimination de la grande majorité des cellules cancéreuses et des tumeurs naissantes. Chez les individus immunodéprimés, une augmentation de l'incidence de certains cancers a été observée. Ces cancers sont surtout des cancers induits par des virus. Ces observations indiquent que le système immunitaire limite la formation de cancers. Cependant, les tumeurs solides ont développé des armes afin d'éviter d'être reconnues par le système immunitaire et donc d'être éradiquées. Il semble que les cellules cancéreuses, alors qu'elles sont hautement immunogéniques, échappent à la destruction immunitaire en invalidant les composants du système immunitaire destinés à les éliminer. En effet, les cellules tumorales peuvent paralyser



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 1.13 : Le bévacizumab comme agent thérapeutique. Le bévacizumab est un anticorps monoclonal qui se lie au VEGF circulant, l'empêchant de se lier à ses récepteurs. L'induction de protéines dégradant la MEC, la prolifération, la migration et l'angiogénèse sont des processus qui sont alors inhibés (Muhsin et al., 2004).

les cellules NK et les CTLs infiltrants, en sécrétant du TGF- β (tumor growth factor- β) ou d'autres facteurs immunosuppresseurs (Hanahan et Weinberg, 2011).

Il est important de noter que la séquence selon laquelle la transformation des cellules normales en cellules malignes se fait est variable d'un cancer à l'autre, voire même au sein d'une tumeur de même nature. En effet, ces différents hallmarks sont des processus qui apparaissent à différents moments du développement tumoral, ils ne suivent pas un ordre bien précis. Néanmoins, le résultat final est le même : la formation d'une masse tumorale (Hanahan et Weinberg, 2000).

1.1.4. Les divers traitements

Depuis de nombreuses années, la recherche dans le domaine du traitement du cancer s'intensifie dû au fait que le cancer représente une des causes majeures de mortalité au niveau mondial. La technique la plus ancienne pour lutter contre cette maladie est la chirurgie mais elle est souvent limitée par l'avancée de la maladie. Elle s'accompagne généralement de radiothérapie, de chimiothérapie et/ou d'hormonothérapie. La chirurgie permet de réduire les risques de dissémination métastatique et de récolter un maximum d'informations (stade de la maladie, agressivité,...).

Un autre traitement utilisé est la radiothérapie qui utilise des rayonnements de très haute énergie engendrant des dommages à l'ADN, qui conduisent finalement à la mort des cellules. Ces rayonnements touchent tous les tissus, à des degrés divers, mais les plus sensibles sont ceux qui ont un taux de renouvellement cellulaire élevé car les mécanismes de réparation y sont moins efficaces. Elle peut aussi être prescrite en association avec d'autres traitements et intervenir à tous les stades de la maladie (en complément d'une chirurgie, curative ou palliative). Cependant des mécanismes de résistance existent.

Plus tard, les agents chimiothérapeutiques sont apparus. Ces molécules peuvent être cytostatiques mais peuvent également endommager l'ADN, menant ainsi à la mort des cellules cancéreuses. Bien qu'attractives, elles présentent une certaine toxicité car elles s'attaquent malheureusement pas uniquement aux cellules cancéreuses mais également à toutes les cellules en prolifération active au niveau du tube digestif, de la moelle osseuse ou des follicules pileux, notamment. De plus, de nombreux phénomènes de résistance ont été observés, c'est pourquoi, de nouvelles stratégies de traitements et de nouvelles molécules doivent être continuellement développées. Ces agents peuvent être synthétisés par des méthodes chimiques mais peuvent aussi être issus de plantes. Généralement, plusieurs agents sont combinés afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles. La chimiothérapie peut aussi être prescrite en association avec d'autres traitements (adjuvante ou néo-adjuvante) et intervenir à tous les stades de la maladie (curative ou palliative).

Depuis seulement quelques années, une nouvelle classe de molécules est apparue sur le marché, ce sont les médicaments ciblés qui ont une action plus spécifique. Ils comportent soit de petites molécules inhibitrices, soit des anticorps monoclonaux. La plupart des traitements par médicaments ciblés sont encore en développement ou en étude clinique (**Figure 1.11**) (Beckman et al., 2006). Un exemple d'un tel médicament déjà mis sur le marché est le bevacizumab. C'est un anticorps monoclonal qui se fixe à un facteur angiogénique circulant, le VEGF. En bloquant le VEGF, la néovascularisation diminue et la croissance tumorale est ralentie. Cependant, chez l'homme, cet anticorps rallonge uniquement la durée de vie de quelques mois, il n'y a pas de rémission complète du patient (**Figure 1.13**) (Ferrara et al., 2004).

Par ailleurs, depuis de nombreuses années, il a été montré que l'alimentation jouait un rôle important dans la progression mais également la prévention du cancer. En effet, les

produits dérivés de l'alimentation peuvent être d'importants agents chimopréventifs et ont comme avantage d'être généralement sûrs (tout dépend de la dose) et de pouvoir s'utiliser à long terme. Cette chimoprévention par l'alimentation pourrait interférer avec l'expression et/ou l'activité de certaines molécules impliquées dans l'initiation et la progression du cancer et préviendrait plus de 30% des malignités (Key, 2011, Kushi et al., 2006, Vossenaar et al., 2011, Wicki et Hagmann, 2011, Wiseman, 2008). Par exemple, il a été montré que la consommation élevée et variée de fruits et de légumes influençait le risque de cancer du poumon, qui est alors réduit (Büchner et al., 2010, Linseisen et al., 2007, Voorrips et al., 2000). En 2000, Kelloff a répertorié plus de 40 agents ou combinaisons d'agents issus de l'alimentation qui étaient testés cliniquement. De plus, certains de ces produits, en plus d'être actifs au niveau de la prévention du cancer, montrent des bénéfices dans d'autres maladies chroniques tels que la protection contre les maladies cardiaques (Kelloff et al., 2000). Par ailleurs, il a été souvent montré que certains « types » de nourriture tels que l'alimentation « occidentale » (alimentation riche en produits animaliers, graisses et sucres) étaient associés à certains cancers tels que celui du colorectum, du sein et de la prostate. Ainsi, l'alimentation est aussi un facteur de risque à prendre en compte, c'est pourquoi, le cancer pourrait être partiellement évité en changeant les habitudes alimentaires (Key et al., 2004, Wiseman, 2008).

Ainsi, en plus de toutes les stratégies thérapeutiques citées ci-dessus, les chercheurs se sont donc aussi intéressés de près à l'utilisation de molécules naturelles notamment issues de plantes, comme nouveaux agents anticancéreux. Parmi ceux-ci, la pectine, un polysaccharide d'origine végétale, a attiré plus particulièrement notre attention et sera détaillée dans le point 1.3.

1.2. La mort cellulaire

1.2.1. **Mise en contexte**

Les différentes chimiothérapies sont connues pour induire des dommages à l'ADN menant à la mort des cellules cancéreuses par divers processus. Trois types de mort cellulaire sont décrits à l'heure actuelle, l'apoptose, l'autophagie et la nécroptose. Nous allons les détailler dans ce chapitre.

1.2.2. **L'autophagie**

a) Généralités

L'autophagie représente une voie lysosomale catabolique et conservée à travers les eucaryotes. Elle est responsable de la dégradation des protéines de longue durée de vie et des organites surnuméraires ou endommagés, pour assurer le recyclage, la dégradation ou la production d'énergie afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. Elle a lieu dans différentes situations de stress telles que l'irradiation, les stress oxydatifs, le manque de nutriments, l'accumulation de protéines mal repliées ou lors de dommages qui seraient toxiques pour la cellule, entre autres. Elle est également impliquée dans le développement normal, la sénescence, la défense contre l'invasion microbienne. Dans ce cas-ci, l'autophagie est considérée comme un mécanisme de survie. De façon intéressante, en plus d'être un mécanisme de survie, l'autophagie (= mort cellulaire programmée de type II) possède également un rôle dans l'induction de la mort cellulaire si les dommages sont trop importants ou si l'apoptose est compromise. Il en existe de trois types qui promeuvent tous la dégradation de composés cytosoliques mais qui diffèrent dans leurs mécanismes et leurs fonctions :

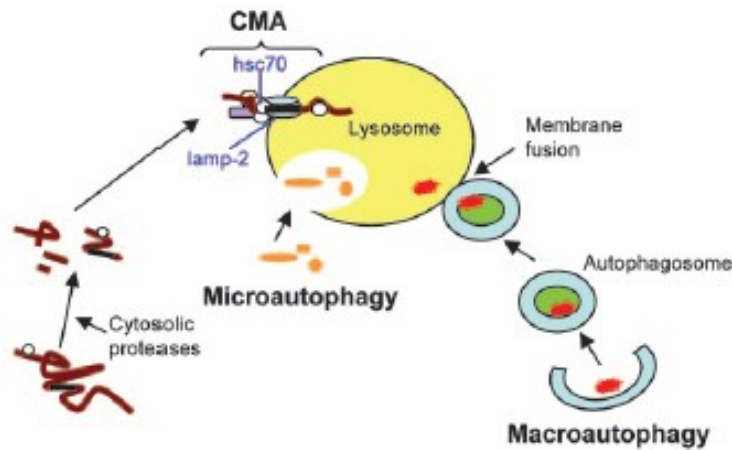


Figure 1.14 : Les différents types d'autophagie. Dans la microautophagie, des portions de cytosol sont internalisées via des invaginations du lysosome. Dans la macroautophagie, le cytoplasme est séquestré à l'intérieur de structures à double membrane, les autophagosomes, qui fusionnent alors avec des lysosomes. Dans l'autophagie médiée par les chaperones, des protéines cytosoliques spécifiques sont transportées à l'intérieur des lysosomes via le complexe composé de Hsc70 et de Lamp-2 (Crotzer et Blum, 2005).

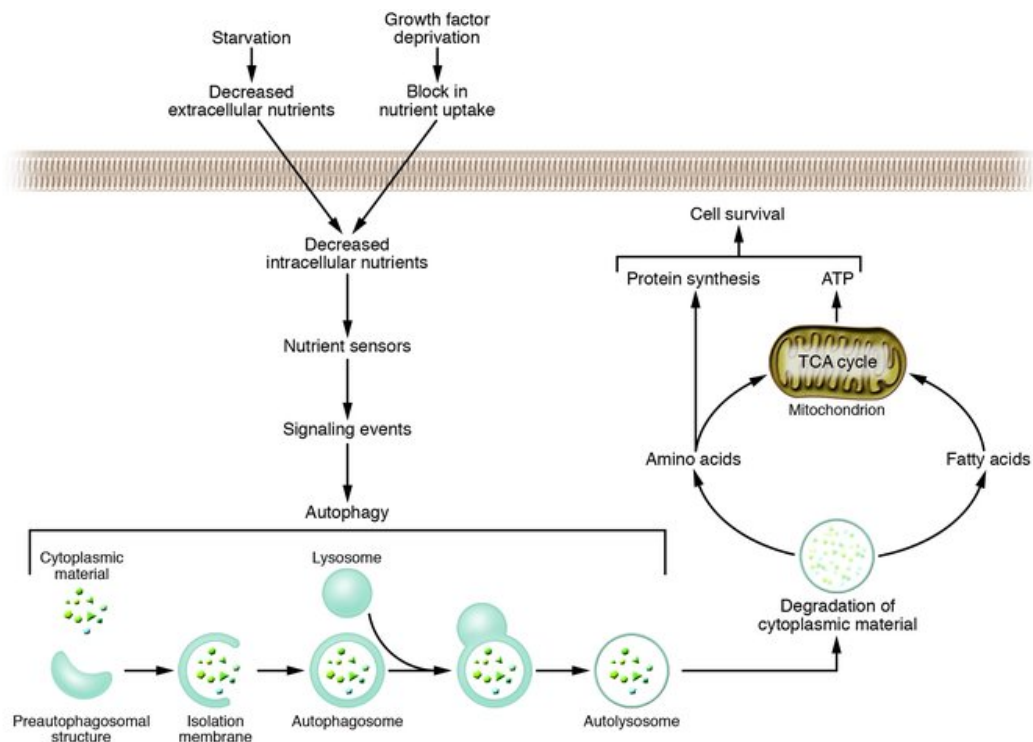


Figure 1.15 : L'autophagie et son rôle dans l'adaptation cellulaire lors de la privation en nutriments. Lors de la diminution de nutriments intracellulaires induite par la famine ou par la privation en facteurs de croissance, l'autophagie est stimulée. Du matériel cytoplasmique est séquestré dans une membrane isolante afin de former une vésicule à double membrane, l'autophagosome. Cet autophagosome fusionne avec un lysosome afin de former un autolysosome, dans lequel le matériel séquestré est dégradé grâce au pH luminal très bas et aux enzymes lysosomales. La dégradation des lipides membranaires et des protéines génère des acides gras et des acides aminés qui peuvent être réutilisés par la cellule pour maintenir la production mitochondriale d'ATP et la synthèse protéique, promouvant ainsi la survie cellulaire. Cette voie intervient également pour dégrader des organites endommagés, des agrégats de protéines ou des pathogènes intracellulaires (Levine et Yuan, 2005).

l'autophagie médiée par les chaperones, la microautophagie et la macroautophagie (**Figure 1.14**) (Chen et Klionsky, 2011, Giansanti et al., 2011, Klionsky, 2007, Notte et al., 2011). Nous détaillerons essentiellement la macroautophagie dans ce travail.

b) L'autophagie médiée par les chaperones

Cette forme d'autophagie se caractérise par la liaison de la protéine chaperone cytosolique Hsc70 (Heat Shock Cognate Protein of 70 kDa) à la protéine cible cytosolique mal repliée via un motif de séquence d'acides aminés particulier, KFERQ. Des co-chaperones viennent moduler cette liaison et amènent le substrat vers le lysosome. Ensuite, le récepteur LAMP-2A (lysosome-associated membrane protein type 2A) situé au niveau de la membrane du lysosome reconnaît ce motif pentapeptidique et la protéine défectueuse est alors dépliée et transloquée directement dans le lysosome pour être dégradée par les hydrolases lysosomales. Il n'y a donc pas de formation de vésicule mais bien une translocation directe à travers la membrane lysosomale, via un mécanisme qui reste encore inconnu (Chen et Klionsky, 2011, Kaushik et al., 2011, Massey et al., 2004, Shpilka et Elazar, 2011).

c) La microautophagie

La microautophagie transloque le matériel cytoplasmique défectueux dans un lysosome ou une vacuole, via une invagination directe, une saillie ou un cloisonnement de la membrane lysosomale ou vacuolaire, dans le but d'y être dégradé (Chen et Klionsky, 2011).

d) La macroautophagie

La macroautophagie (= autophagie proprement dite) est un processus de mort cellulaire extrêmement régulé et comporte quatre étapes : l'induction qui initie la voie, la nucléation de la vésicule qui permet la formation de la double membrane de l'autophagosome, l'élongation qui permet l'expansion de l'autophagosome et la formation de l'autolysosome qui résulte de la fusion entre l'autophagosome et un lysosome. Ainsi, l'autophagie délivre des portions de cytosol, incluant éventuellement des organites, aux lysosomes via une vésicule ayant une double membrane. Bien que l'autophagie soit généralement considérée comme non spécifique, il existe plusieurs exemples d'autophagie sélective englobant des organites : mitophagie (pour les mitochondries), ribophagie (pour les ribosomes), pexophagie (pour les peroxisomes), réticulophagie (pour le réticulum endoplasmique, RE). La fusion de la vésicule avec un lysosome permet l'hydrolyse de son contenu par des hydrolases acides lysosomales. Des perméases et des transporteurs peuvent alors exporter des acides aminés et d'autres biomolécules vers le cytosol où ils peuvent être réutilisés pour le métabolisme et la synthèse de nouvelles macromolécules (**Figure 1.15**).

Les différentes voies de signalisation qui initient l'autophagie convergent au niveau d'une protéine kinase sérine/thréonine, mTOR (mammalian target of rapamycin). mTOR intègre les signaux via la voie PI3K/Akt et via le senseur énergétique AMPK (AMP-activated kinase) qui détecte le statut nutritif cellulaire ou le niveau d'ATP intracellulaire. Dans des conditions riches en nutriments, mTOR régule négativement Atg1 (autophagy related gene 1) ou ses homologues mammaliens, ULK-1 et -2 (Unc-151-like kinase), bloquant leur activité kinase et inhibant ainsi l'induction de l'autophagie. Ainsi, pour permettre l'induction de l'autophagie, mTOR doit être inactivé. Cette inactivation stimule alors l'activité catalytique d'Atg1, ce qui induit l'autophagie. En plus du manque de nutriments, divers stimuli tels que l'accumulation de ROS ou les stress du RE, entre autres, peuvent initier l'autophagie.

Différentes protéines Atg font partie de la machinerie de l'autophagie et sont impliquées dans les étapes suivantes. Par exemple, la bécline-1, un membre de la famille BCL-2 et homologue mammalien du gène Atg6 de la levure, s'associe avec Vps34 (= phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)), UVRAG (UV irradiation resistance-associated tumor

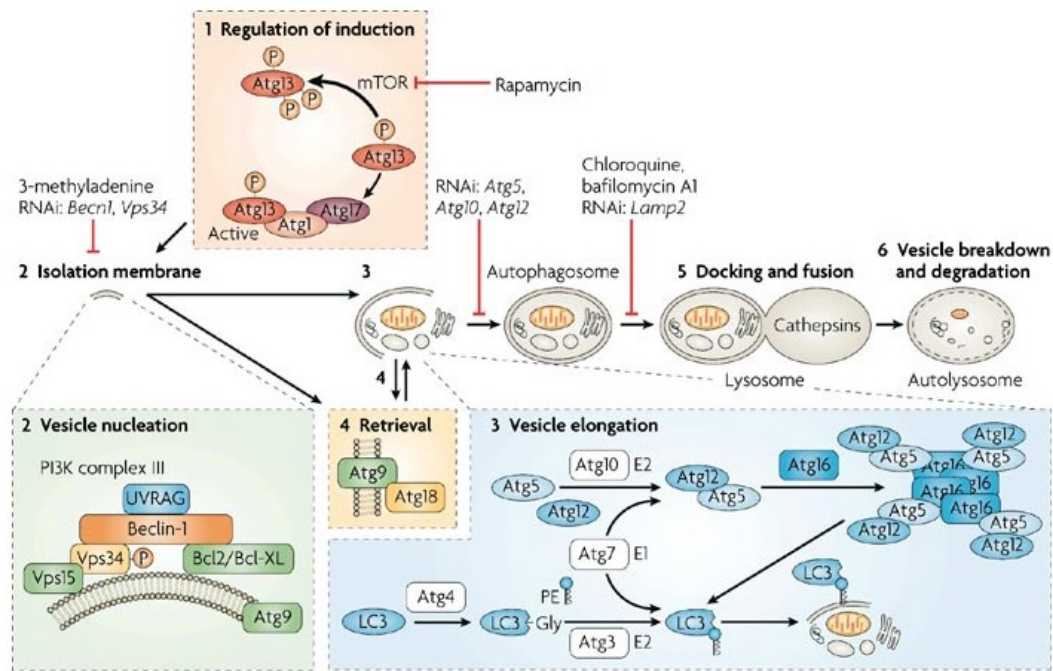


Figure 1.16 : L'autophagie et ses inhibiteurs. La première étape est l'inactivation de mTOR, une protéine kinase sérine/thréonine inhibant l'autophagie. Cette inactivation stimule alors l'activité catalytique d'Atg1. Après l'induction, la nucléation de la vésicule prend place. Vps34 est activée et cette activation dépend d'un complexe multiprotéique formé de Bécline-1 et d'UVRAG, entre autres. Ce complexe génère alors du phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P), essentiel à la formation de l'autophagosome. Ensuite, deux systèmes de conjugaison ubiquitine-like participent à l'élongation de la vésicule : Atg12-Atg5 et LC3-phosphatidylethanolamine. Enfin, l'autophagosome fusionne avec un lysosome via LAMP2 et Rab7 et la vésicule ainsi que le contenu sont dégradés par le pH luminal très bas et les enzymes lysosomales. Différents inhibiteurs et siRNAs, qui sont capables d'inhiber certaines étapes de l'autophagie, sont mentionnés (Maiuri et al., 2007).

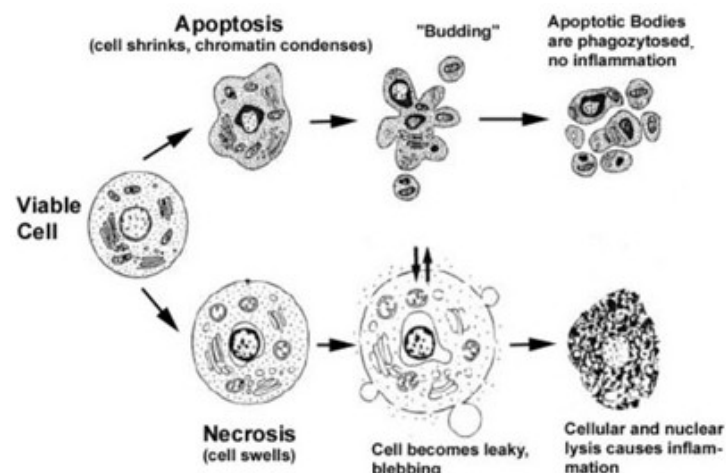


Figure 1.17 : L'apoptose et la nécrose, deux voies de mort cellulaires différentes. L'apoptose se caractérise par une contraction cellulaire, par une condensation de la chromatine et par la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules environnantes tout en évitant une réponse inflammatoire. La nécrose se caractérise par une perte de l'intégrité membranaire et par le gonflement de la cellule et des organites. Le contenu cellulaire est alors libéré de manière incontrôlée dans l'environnement cellulaire, ce qui par conséquent, provoque une forte réponse inflammatoire (Gewies, 2003).

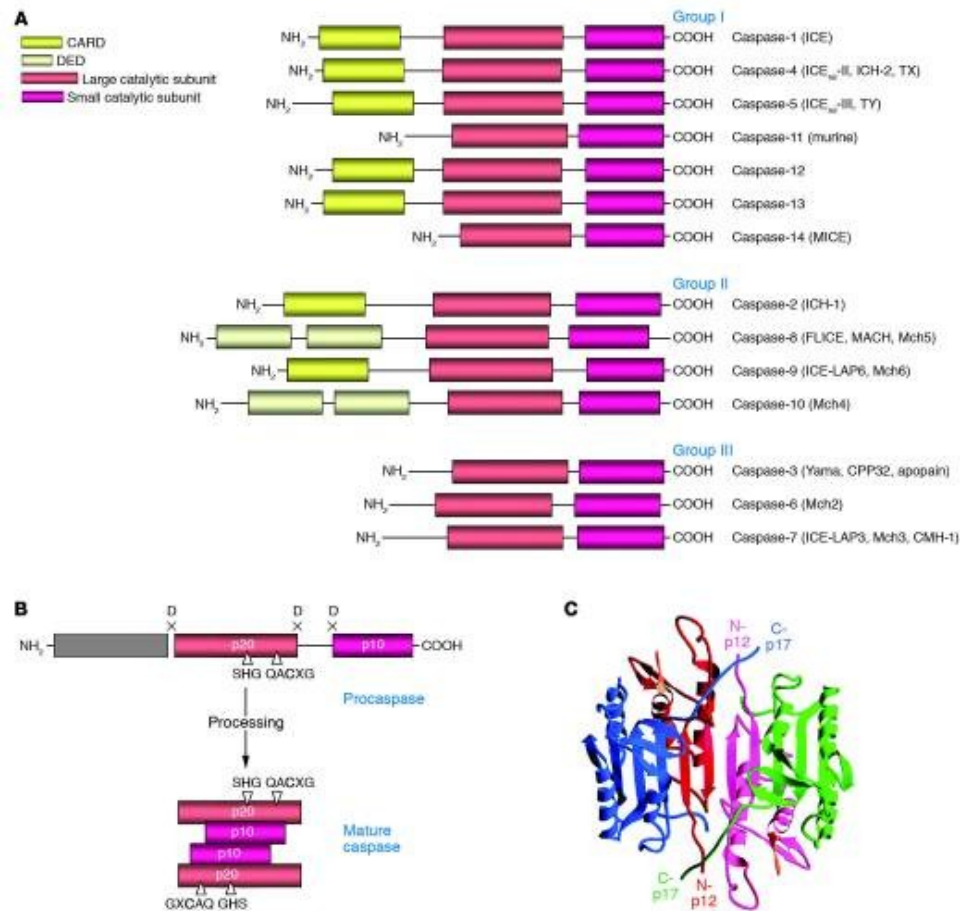


Figure 1.18 : Les caspases, les exécuteurs de l'apoptose. (A) Il existe trois groupes : les caspases inflammatoires impliquées dans l'inflammation plutôt que dans l'apoptose, les caspases initiatrices qui médient l'interaction avec les molécules adaptatrices situées en amont et les caspases effectrices qui sont clivées et activées par les caspases initiatrices. (B) Le clivage des pro-caspases permet leur activation. (C) La structure 3D des caspases qui forment un tétramère (Lavrik et al., 2005).

suppressor gene) et d'autres partenaires afin de permettre la nucléation de la vésicule. Ce complexe génère du phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P), essentiel à la formation de l'autophagosome. La double membrane de cette vésicule peut dériver du RE, de l'appareil de Golgi, de la membrane mitochondriale externe ou de la membrane plasmique.

Ensuite, pour l'élongation de l'autophagophore, deux systèmes ubiquitin-like sont requis. Le premier conjugue Atg5 à Atg12 via des activités E1- et E2-like d'Atg7 et d'Atg10, respectivement. Le complexe Atg5-Atg12 s'oligomérisé et se localise au niveau de la membrane externe de la membrane en expansion. Le second système lie Atg8 (aussi appelé LC3), qui a été clivé par Atg4 en LC3-I cytoplasmique, à la phosphatidyléthanolamine (PE), ce qui mène à la conversion de la forme soluble de LC3-I vers la forme LC3-II (LC3-I + PE) via des activités E1- et E2-like d'Atg7 et d'Atg3, respectivement. LC3-II est alors recruté au niveau des membranes interne et externe de la vésicule. Ces deux complexes sont requis pour l'élongation et la fusion de la membrane menant à la formation d'une vésicule fermée (**Figure 1.16**).

Enfin, l'autophagosome fusionne avec un lysosome via LAMP2 et Rab7 (petite GTPase), pour former un autolysosome dans lequel le contenu de la vésicule autophagique est dégradé par le pH luminal très bas et les hydrolases acides lysosomales. L'autolysosome est une vésicule acide constituée d'une simple membrane issue de l'autophagosome. Les produits de dégradation (nucléotides, acides aminés, acides gras libres) sont alors transportés dans le cytosol, via des perméases spécifiques, afin d'être réutilisés (synthèse de macromolécules ou production d'ATP). Il est à noter que des endosomes peuvent fusionner avec des autophagosomes et former des amphisomes qui vont également fusionner avec des lysosomes. Ainsi, il existe une convergence entre l'endocytose et l'autophagie (Giansanti et al., 2011, Horbinski et al., 2010, Kimmelman, 2011, Klionsky, 2007, Levine et Yuan, 2005, Maiuri et al., 2007, Ravikumar et al., 2009, Janku et al., 2011).

1.2.3. L'apoptose

a) Généralités

L'apoptose ou mort cellulaire programmée de type I régule l'homéostasie cellulaire et/ou élimine les cellules endommagées ou infectées en suivant une séquence d'événements menant à la mort cellulaire. Ces événements sont : la contraction cellulaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, le bourgeonnement de la membrane cellulaire (corps apoptotiques), et enfin, l'engloutissement par les macrophages ou les cellules voisines des corps apoptotiques tout en évitant une réponse inflammatoire (**Figure 1.17**). Deux voies majeures apoptotiques existent : la voie extrinsèque médiée par les récepteurs de mort et la voie intrinsèque médiée par la mitochondrie. Ces deux voies mènent à un événement important, l'activation des caspases (cystéinyl aspartate protéase), des protéases à cystéine, synthétisées en temps que zymogènes inactifs et qui sont les initiateurs et les exécuteurs de l'apoptose lorsqu'elles sont activées par clivage. Ces enzymes clivent différents substrats dans une séquence en acides aminés particulière contenant un aspartate. Il en existe trois groupes : (1) les caspases inflammatoires (caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 et 14) impliquées dans l'inflammation plutôt que l'apoptose; (2) les caspases initiateurs (caspases 2, 8, 9, 10) qui médient l'interaction avec les molécules adaptatrices situées en amont; (3) les caspases effectrices (caspases 3, 6, 7) qui sont clivées et activées par les caspases initiateurs et qui accomplissent les dernières étapes de l'apoptose en clivant de nombreux substrats cellulaires (**Figure 1.18**) (Boatright et Salvesen, 2003, Cohen, 1997, Jin et El-Deiry, 2005).

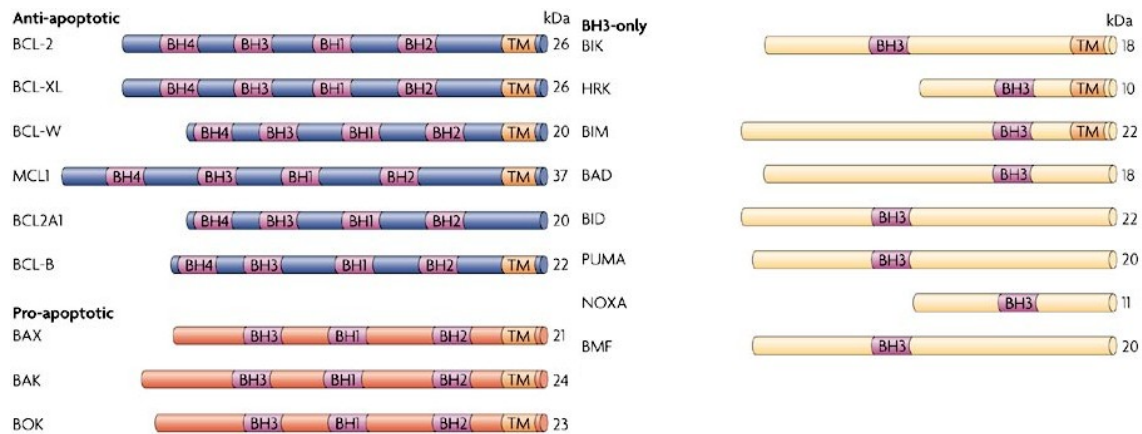


Figure 1.19 : Les protéines de la famille BCL-2. Il existe trois groupes : les anti-apoptotiques qui promeuvent la survie cellulaire, les pro-apoptotiques qui favorisent l'apoptose et les BH3-only qui possèdent uniquement le court domaine d'interaction BH3 qui est nécessaire et probablement suffisant pour induire l'apoptose (Taylor et al., 2008).

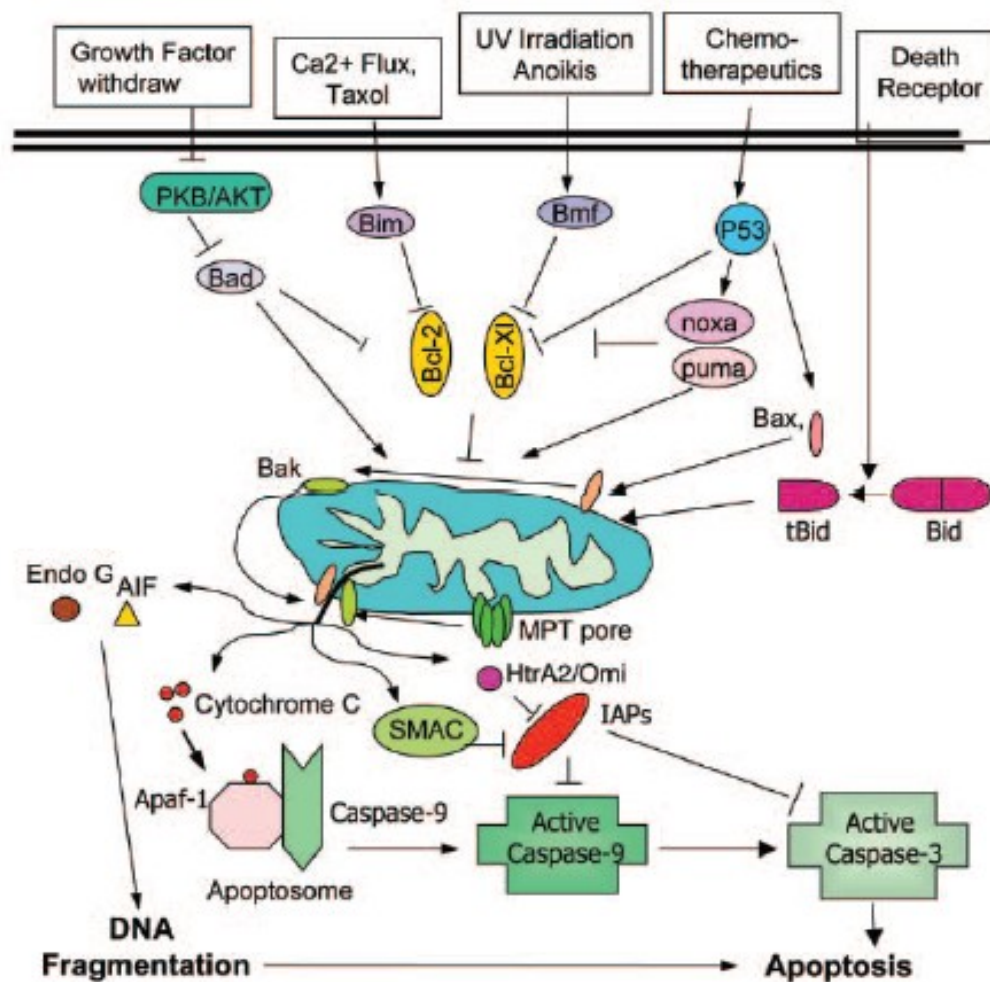


Figure 1.20 : La voie intrinsèque de l'apoptose. Elle est initiée par différents facteurs comme le flux de calcium, les agents chimiothérapeutiques ou le manque de facteurs de croissance. Les protéines BH3-only sont sensibles à ces facteurs de stress et transmettent les signaux aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Bax et Bak vont alors s'oligomériser afin de former des canaux et libérer ainsi dans le cytoplasme des protéines mitochondriales comme le cytochrome c (Jin et El-Deiry, 2005).

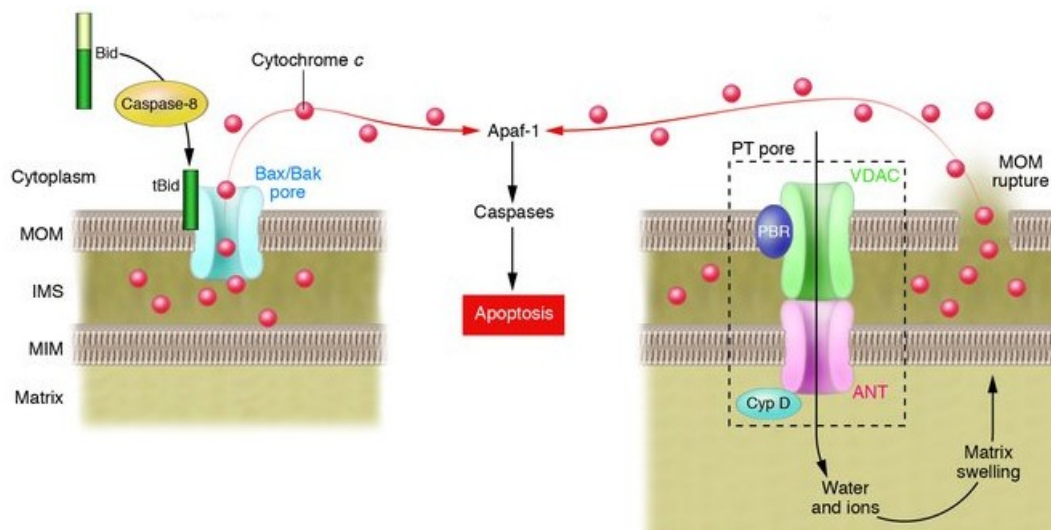


Figure 1.21 : Mécanismes moléculaires de la MOMP. Deux modèles sont proposés pour libérer le cytochrome c. Le premier est la formation d'un pore Bax/Bak dans la MOM après activation par des protéines BH3-only. Le deuxième est l'ouverture du pore PT formé de VDAC et d'ANT. Cette ouverture permet un influx d'eau et d'ions vers la matrice, causant un gonflement de la matrice. Ce gonflement mène à la rupture de la MOM, libérant ainsi le cytochrome c (Bouchier-Hayes et al., 2005).

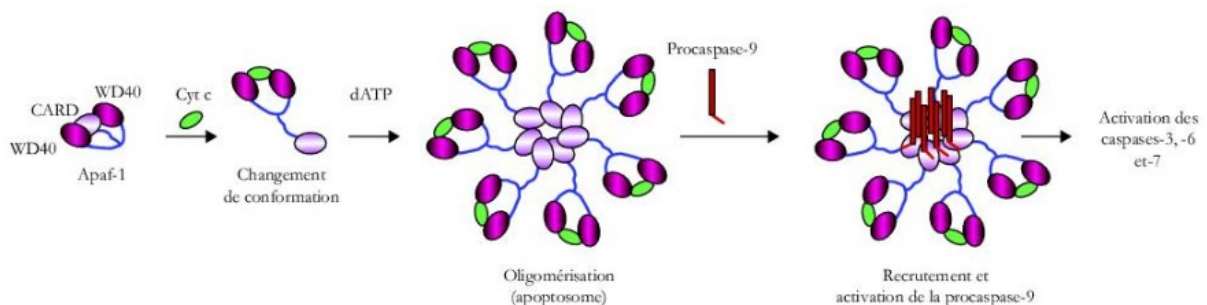


Figure 1.22 : L'apoptosome, un activateur des pro-caspases effectrices dans la voie intrinsèque. Le cytochrome c libéré lors de la MOMP se lie à Apaf-1, générant un changement de conformation et la mise en place de l'apoptosome. Ce complexe recrute alors la pro-caspase-9 afin de l'activer. Cette activation permet le clivage des caspases exécutrices 3, 6 et 7 et donc à l'activation de l'apoptose (Ségal-Bendirdjian et al., 2005).

b) La voie intrinsèque

La voie intrinsèque est initiée par des signaux intrinsèques tels que les dommages à l'ADN induits par des irradiations UV ou des attaques chimiques, par la privation en facteurs de croissance, par une surcharge en calcium ou par un stress oxydatif. Tous ces signaux convergent vers la mitochondrie. Cette voie est caractérisée par la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) qui est principalement médiée et contrôlée par certains membres de la famille BCL-2. Dès l'apparition de cette MOMP, des molécules impliquées dans l'apoptose sont libérées et les fonctions mitochondriales essentielles pour la survie cellulaire sont perdues.

Chez les mammifères, il existe environ 20 membres de la famille Bcl-2 qui peuvent être divisés, selon leurs structures et leurs fonctions, en au moins trois groupes qui contiennent tous au moins un domaine BH (Bcl-2 Homology) conservé. Les membres du groupe anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, A1 et Mcl-1) promeuvent la survie cellulaire. La protéine de pro-survie Bcl-2 est localisée dans la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et la membrane périmitochondriale. Cette protéine est inhibée lors de stress menant à l'activation de l'apoptose. Le deuxième groupe est celui des BH3-only (Bim, Bid, Bad, Noxa, Puma) qui possèdent uniquement le court domaine d'interaction BH3 qui est nécessaire et probablement suffisant pour induire l'apoptose (**Figure 1.19**). Ces protéines BH3-only sont sensibles aux signaux de stress et transmettent ces signaux aux autres membres de la famille Bcl-2. Cependant, ces protéines sont sensibles spécifiquement à certains stress. Par exemple, Puma et Noxa sont sensibles aux dommages à l'ADN car ils sont induits par p53, alors que Bad est sensible au manque de facteurs de croissance (**Figure 1.20**). Ces protéines peuvent alors inhiber l'action des membres anti-apoptotiques. La dernière sous-famille est celle des protéines pro-apoptotique (Bax, Bak) qui favorisent l'apoptose. Lorsque ces protéines sont absentes, l'apoptose n'est plus possible et l'autophagie prend alors le relais. La protéine Bax se trouve essentiellement sous une forme monomérique cytosolique dans les cellules saines tandis que durant l'apoptose, elle subit un changement de conformation et est transloquée alors au niveau de la membrane mitochondriale externe et s'oligomérisise. Bak est présent en temps que monomère dans la membrane externe mitochondriale dans les cellules saines tandis que durant l'apoptose, il subit aussi un changement conformationnel et forme des agrégats.

Suite à l'inhibition des protéines anti-apoptotiques et l'activation des protéines BH3-only via les signaux intrinsèques de stress, Bax et/ou Bak s'oligomérisent au niveau de la membrane externe de la mitochondrie afin de former des canaux qui permettent la translocation de nombreuses protéines apoptogènes de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol (**Figure 1.21**). En parallèle, les fonctions mitochondriales essentielles sont perturbées menant à la mort cellulaire. Suite à la MOMP, la mitochondrie libère notamment le cytochrome c, qui est connu pour agir au niveau de la chaîne de transport des électrons. Le cytochrome c cytosolique se lie alors à Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor 1), ce qui recrute la pro-caspase 9, générant un complexe nommé apoptosome. Dans l'apoptosome, la pro-caspase 9 est activée par clivage en caspase 9, menant ainsi au clivage des caspases exécutrices 3, 6 et 7 et donc à l'activation de l'apoptose (**Figure 1.22**). D'autres protéines mitochondriales sont libérées suite à la MOMP, comme AIF (apoptosis-inducing factor) ou l'endonucléase G (EndoG). Ces protéines induisent directement la fragmentation de l'ADN et promeuvent l'apoptose indépendante des caspases en perméabilisant la membrane lysosomale, résultant en une libération de protéases de type cathepsines dans le cytosol. Il est à noter que les cathepsines peuvent également déclencher la MOMP, stimulant ainsi la voie de l'apoptose dépendante des caspases. De plus, certaines protéines libérées lors de la MOMP sont des antagonistes des IAPs (inhibitor of apoptosis) tels que Omi ou Smac/DIABLO. Les IAPs sont des protéines cytosoliques qui empêchent la mise en place de l'apoptose en inhibant

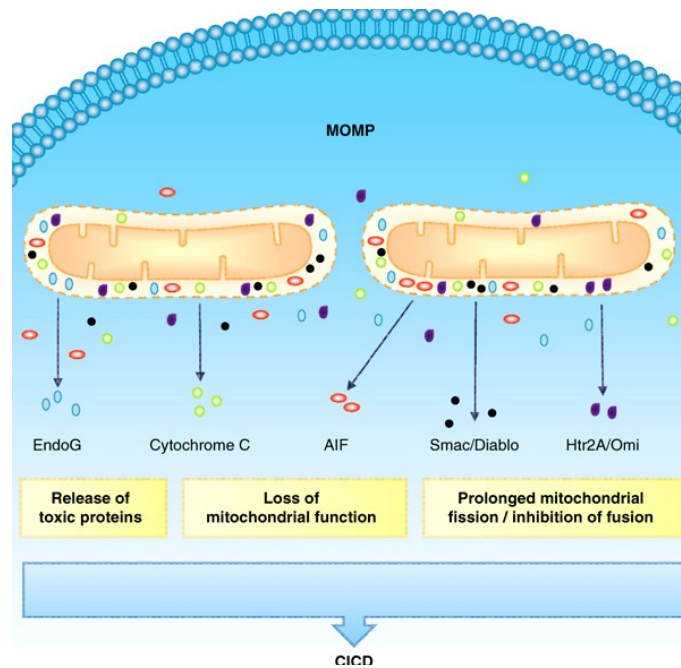


Figure 1.23 : L'apoptose peut être indépendante des caspases. En plus du cytochrome c libéré lors de la MOMP, AIF, l'endonucléase G, Smac et Omi peuvent également se retrouver dans le cytoplasme. Ainsi, la libération de molécules toxiques, la perte de fonction mitochondriale et la fission prolongée (ou la fusion inhibée) des mitochondries conduit à l'apoptose indépendante des caspases (Tait et Green, 2008).

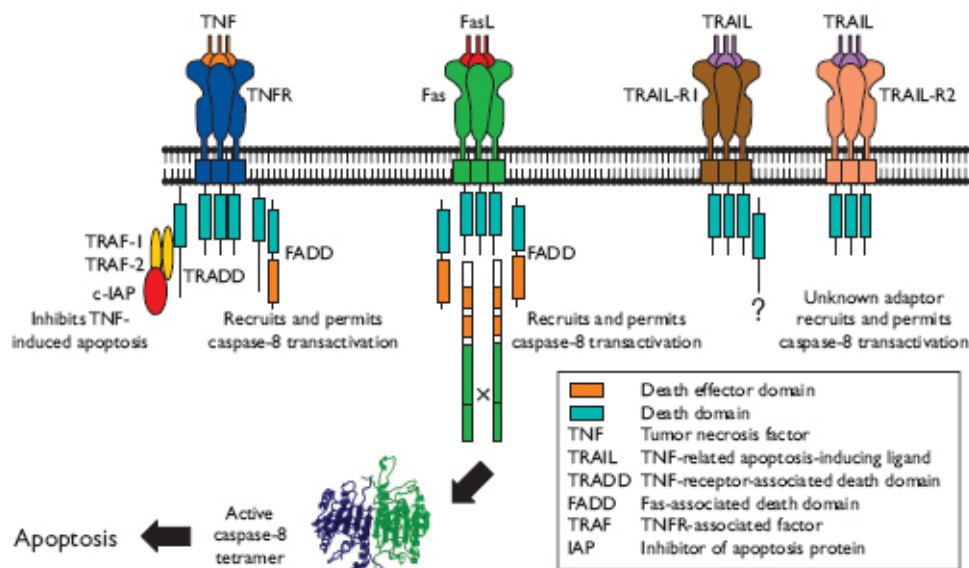


Figure 1.24 : Les récepteurs de mort impliqués dans la voie extrinsèque de l'apoptose. Ils sont au nombre de trois : le TNFR-1 qui lie le TNF, le récepteur CD95/Fas qui lie le FasL et TRAIL-R1 et R2 qui lie le TRAIL. Ils aboutissent tous à l'activation de la caspase-8 (http://www.abdserotec.com/antibodies/apoptosis_cell_membrane_receptors-1015.html).

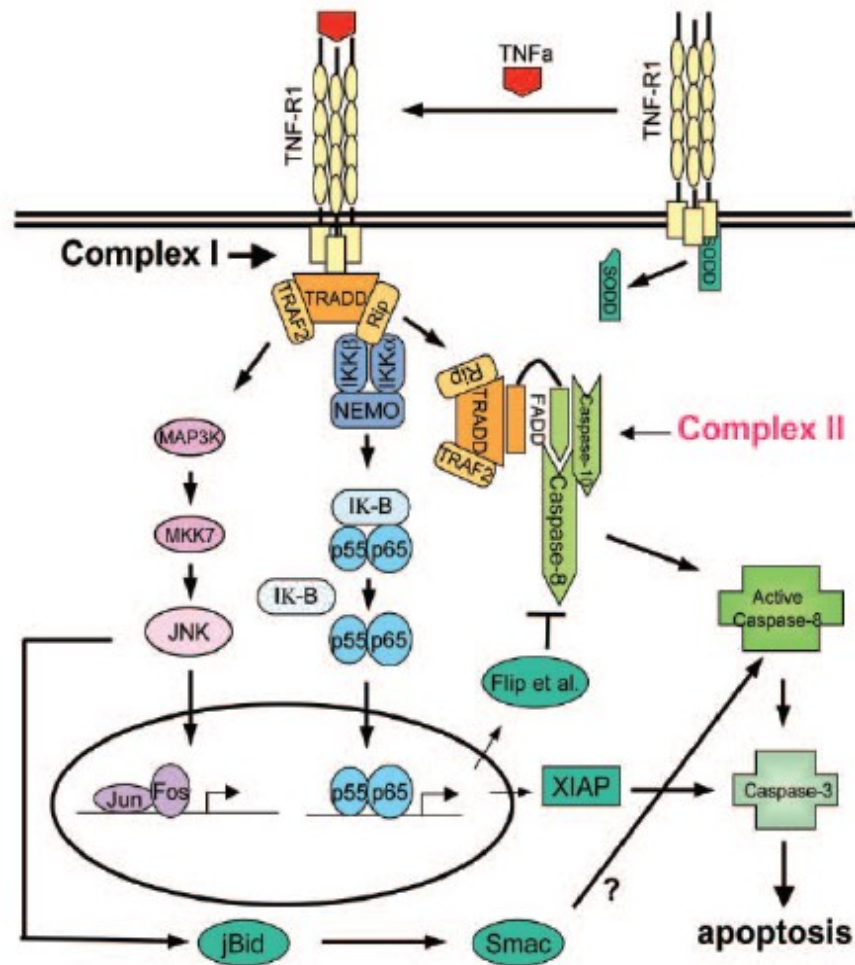


Figure 1.25 : La voie extrinsèque de l'apoptose (via le TNFR-1). Le TNF est reconnu par son récepteur TNFR-1. Cette reconnaissance entraîne la libération de SODD, ce qui permet le recrutement de TRADD. TRADD se lie alors à TRAF2, activant la voie JNK. Les kinases JNK transloquent dans le noyau et augmentent l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription tels que c-Jun et ATF2 qui jouent un rôle dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération. TRADD lie également RIP1, activant la voie NF-κB, favorisant la survie cellulaire. Pour enclencher l'apoptose, le complexe formé de TRADD, TRAF2 et RIP1 s'associe à FADD, recrutant ainsi les pro-caspases 8 et 10. Ce complexe active ensuite les caspases effectrices, c'est-à-dire les caspases 3, 6 et 7 qui sont les effecteurs de l'apoptose (Jin et El-Deiry, 2005).

les caspases. Les caspases sont alors ubiquitinées et dégradées par le protéasome. Les antagonistes des IAPs se lient aux IAPs, ce qui les inhibent et les dégradent, activant ainsi les caspases (**Figure 1.23**) (Adams et Cory, 2007, Ghiotto et al., 2010, Giansanti et al., 2011, Indran et al., 2011, Jin et El-Deiry, 2005, Leibowitz et Yu, 2010, Maiuri et al., 2007, Martinou et Youle, 2011, Parsons et Green, 2009).

c) La voie extrinsèque

La voie extrinsèque se caractérise par la stimulation des récepteurs de mort par leurs ligands respectifs. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires arrangées en homotrimères stables et membres de la famille des TNFR (tumor necrosis factor receptor) : le TNFR-1 qui lie le TNF (tumor necrosis factor), le récepteur CD95/Fas qui lie le FasL et TRAIL-R1 et R2 qui lie le TRAIL (**Figure 1.24**). Cette voie est initiée par des facteurs extrinsèques tels que l'infection des cellules par des virus. Après liaison, le récepteur subit un changement conformationnel, ce qui résulte en la formation du complexe DISC (death-inducing signaling complex) qui recrute différents adaptateurs. Nous allons détailler uniquement la voie du TNFR qui est la mieux caractérisée.

Le TNF est une cytokine pro-inflammatoire multifonctionnelle produite par les macrophages et est impliquée dans la progression de nombreuses maladies comme les maladies autoimmunes, les maladies neurodégénératives ou le cancer. Il existe deux récepteurs principaux au TNF, le TNFR-1 exprimé dans la plupart des tissus et médiateur principal de la signalisation du TNF, et le TNFR-2 trouvé surtout dans le système immunitaire et qui peut seulement être activé par le TNF lié à la membrane mais pas par du TNF soluble. La reconnaissance du TNF au TNFR-1 entraîne la libération de SODD (silencer of death domain), protéine qui inhibe le TNFR-1 en condition de repos, ce qui permet le recrutement de TRADD (TNFR1-associated death domain) via des interactions homophiliques des domaines de mort du TRADD et du TNFR-1 (**Figure 1.25**). TRADD peut alors lier TRAF2 (TNF receptor-associated factor-2). Cette liaison induit l'activation de la voie JNK (c-Jun N-terminal kinase). Cette activation passe par l'implication de plusieurs protéines telles que la MKK7. Après l'activation, les kinases JNK transloquent dans le noyau et augmentent l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription tels que c-Jun et ATF2. Ces protéines ont un rôle important dans de nombreux processus cellulaires (prolifération, différenciation et protection contre l'apoptose). En plus de lier TRAF2, TRADD lie la protéine RIP1 (receptor-interacting kinase), ce qui permet d'activer la voie NF- κ B (nuclear factor kappa B). En effet, RIP1 recrute et stabilise le complexe IKK (I κ B kinase). Ce complexe, formé de deux protéines kinases (IKK α et IKK β) et d'une protéine régulatrice, NEMO (NF- κ B essential modulator), phosphoryle l'inhibiteur I κ B de NF- κ B, permettant alors la dégradation protéolytique d'I κ B via le protéasome et la libération de NF- κ B qui transloque dans le noyau afin d'activer ses gènes cibles impliqués dans la réponse inflammatoire, la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (IAP, Bcl-XL, Flip, etc). Le complexe formé du TNFR-1, de TRADD, de RIP1 et de TRAF2 est appelé le complexe I qui est lié à la membrane plasmique. Ces deux voies (JNK et NF- κ B) médient une voie de signalisation favorable à la survie des cellules. L'effet cytotoxique du TNF, mettant en place l'apoptose, se manifeste lorsque l'activation de NF- κ B est bloquée (inhibition de la synthèse protéique ou surexpression d'I κ B). Pour ce faire, TRADD lié à RIP1 et TRAF2 s'associe avec FADD (Fas-associated death domain), ce qui permet de recruter les pro-caspases 8 et 10, formant ainsi le complexe II cytoplasmique (= DISC). Lorsque NF- κ B est activé par le complexe I, il transcrit la protéine Flip qui inhibe la pro-caspase 8, permettant à la cellule de survivre. Dans le cas de l'apoptose, Flip n'est plus transcrit et n'inhibe plus la pro-caspase 8, qui est alors activée. DISC active ensuite, les caspases effectrices, c'est-à-dire les caspases 3, 6 et 7 qui sont les effecteurs de l'apoptose. DISC peut également faire intervenir la mitochondrie afin de

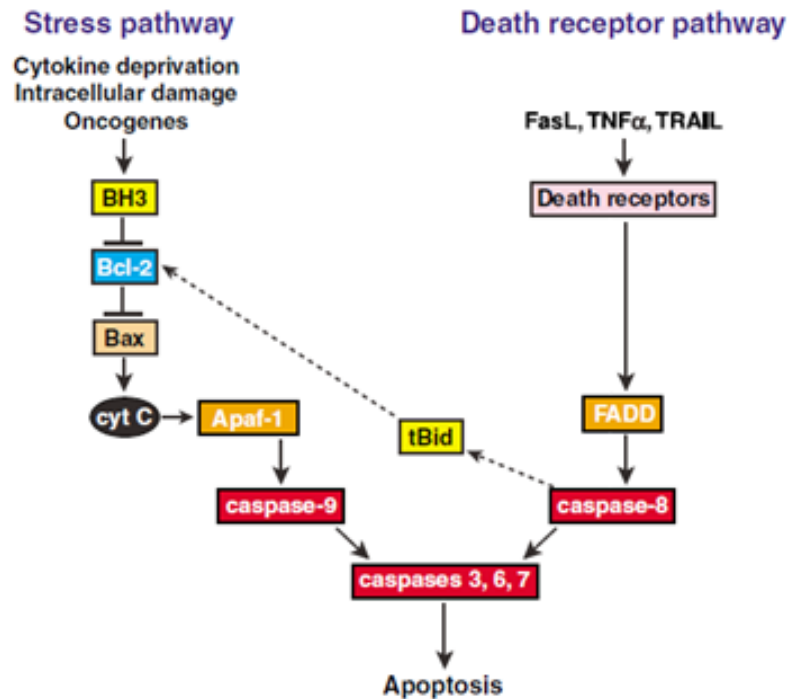


Figure 1.26 : La convergence de la voie intrinsèque et de la voie extrinsèque de l'apoptose. La voie intrinsèque médiée par des facteurs de stress, active des protéines BH3-only, qui inhibent à leur tour, les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2. Les protéines pro-apoptotiques comme Bax sont alors activées et recrutées en membrane mitochondriale, mettant en place la MOMP et libérant le cytochrome c. Ce dernier se lie à Apaf-1, formant ainsi l'apoptosome et activant la pro-caspase-9, menant à l'activation des caspases effectrices et à l'apoptose. La voie extrinsèque est initiée par des récepteurs de mort. Cette voie mène à l'activation de FADD, qui active la caspase-8, menant à l'activation des caspases effectrices et de l'apoptose. La caspase-8 peut également cliver Bid qui va transloquer vers la mitochondrie, menant à la MOMP (Adams et Cory, 2007).

déclencher l'apoptose. En effet, Bid est clivé par la caspase 8. tBid (Bid clivé) peut alors transloquer vers la mitochondrie, menant à la dysfonction mitochondriale (MOMP) et à la formation de l'apoptosome. La caspase 3 peut alors subir une protéolyse afin d'être activée (Adams et Cory, 2007, Giansanti et al., 2011, Indran et al., 2011, Maiuri et al., 2007, Jin et El-Deiry, 2005, Van Herreweghe et al., 2010, Verstrepen et al., 2008).

d) Convergence des deux voies

Ainsi, il existe deux voies pour induire l'apoptose (extrinsèque et intrinsèque), dont les signaux initiateurs sont différents mais qui convergent vers le clivage de la caspase 3 par les caspases initiatrices, permettant son activation (**Figure 1.26**). Cette caspase effectrice clive alors ses différents substrats cellulaires qui sont des protéines du cytosquelette comme l'actine, des protéines nucléaires comme la laminine, des protéines réparant les dommages à l'ADN comme la topoisomérase ou PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) et des protéines de régulation comme Bcl-2, Bcl-XL, p21 ou IAPs. Ces clivages initient ensuite les dernières étapes de l'apoptose qui consistent à emballer le contenu cellulaire dans des corps apoptotiques, qui seront ensuite phagocytés. Cette phagocytose est médiée par les macrophages et les cellules voisines qui reçoivent des signaux de la cellule en apoptose. Ces signaux sont par exemple, la phosphatidylsérine, qui est normalement présente dans le feuillet cytoplasmique de la membrane cellulaire, mais qui se retrouve dans le feuillet externe et donc exposée à la surface de la cellule en apoptose (Jin et El-Deiry, 2005).

1.2.4. La nécrose / La nécroptose

a) Généralités

La nécrose (mort cellulaire de type III) se distingue de l'apoptose par le fait que les cellules souffrent d'une agression majeure menant à une perte de l'intégrité membranaire et au gonflement de la cellule et des organites. On n'observe pas de désintégration nucléaire, ni de corps apoptotiques. Le contenu cellulaire est alors libéré de manière incontrôlée dans l'environnement cellulaire, ce qui endommage les cellules avoisinantes et, en conséquence, une forte réponse inflammatoire se met en place (**Figure 1.17**). Ainsi, ce phénomène n'est pas spécifique et n'est pas régulé. Cependant, depuis quelques années, une nouvelle notion est apparue, celle de la nécroptose ou « nécrose programmée ». Cette voie se caractérise par des déclencheurs spécifiques et une cascade de signalisation élaborée (contrairement à la nécrose). Elle n'est donc pas simplement une « mort accidentelle », mais plutôt une forme « programmée » de mort cellulaire. Elle est impliquée dans de nombreuses pathologies humaines telles que l'infection virale et les maladies neurodégénératives. Cependant, peu est connu sur cette voie à l'heure actuelle (Challa et Chan, 2010, Christofferson et Yuan, 2010, Vandenabeele et al., 2008, Vandenabeele et al., 2010).

b) La voie nécroptique

Bien que la nécroptose se distingue de l'apoptose, ce ne sont pas deux voies « opposées ». En effet, la nécroptose peut se déclencher via une stimulation « extrinsèque » par des ligands reconnus par des récepteurs de mort comme le TNFR-1, le FAS, ou le TRAILR-1 et 2, c'est-à-dire, les mêmes récepteurs que ceux impliqués dans l'apoptose, ou par des signaux « intrinsèques » comme les dommages à l'ADN. La voie la mieux caractérisée est celle initiée par le TNFR. Il est important de noter que selon le type cellulaire, le stade d'activation cellulaire et les facteurs microenvironnementaux, la voie du TNF peut mener à la survie cellulaire, à l'apoptose ou à la nécroptose. Ainsi, il peut y avoir des 'switchs' entre les différentes réponses.

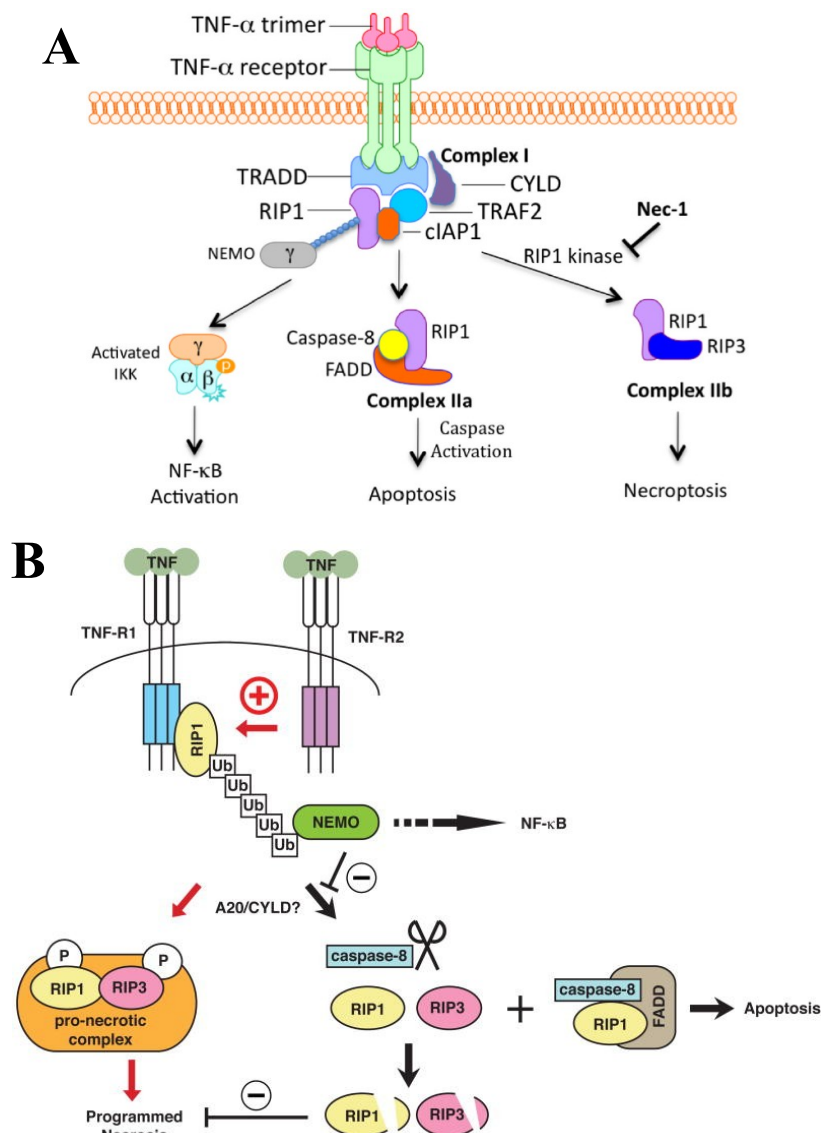


Figure 1.27 : La nécroptose, la troisième voie de mort cellulaire. (A-B) Comme décrit dans la figure 1.24, le TNFR-1 active la voie NF- κ B et la voie de l'apoptose. Afin d'activer la voie nécroptique, RIP1 cytosolique interagit avec RIP3 pour former le complexe IIb (= nécrosome). Ce nécrosome permet la mise en place de la nécroptose et sa formation requiert l'activité kinase de RIP1 et RIP3 (**A** Christofferson et Yuan, 2010, **B** Challa et Chan 2010).

En absence de TNF- α , les sous-unités du TNFR1 s'assemblent spontanément au niveau de la membrane plasmique afin de générer des récepteurs trimériques. Lors de la liaison du ligand, ce trimère subit un changement de conformation qui lui permet de recruter, dans sa portion cytoplasmique, diverses protéines telles que TRADD, RIP1, IAP1 et 2, TRAF2 et 5. Cette structure est appelée le complexe I. Les IAPs, des ubiquitine ligases E3 connues pour inhiber l'apoptose en interférant avec l'activation des caspases, sont recrutées par TRAF2 au complexe, ce qui le stabilise et le polyubiquitine au niveau de RIP1 qui est une sérine-thréonine kinase et senseur de stress cellulaire. RIP1 recrute alors NEMO, une sous-unité régulatrice du complexe IKK, qui active à son tour la voie NF- κ B. Dans ce cas-ci, l'action est cytoprotective, comme mentionné précédemment.

L'état d'ubiquitination de RIP1 détermine ses fonctions. Soit cette protéine est ubiquitinée et agit comme une molécule favorisant la survie, comme montré ci-dessus, soit RIP1 polyubiquitiné peut être déubiquitiné par la CYLD (Lys63-deubiquitylating enzyme cylindromatosis) et promeut alors la mort cellulaire via la formation du complexe IIa. Pour se faire, RIP1 se dissocie du complexe I et se retrouve dans le cytosol sous forme du complexe IIa qui se compose de RIP1, de FADD et de la pro-caspase-8. La caspase 8 inactive RIP1 et RIP3 par clivage protéolytique et initie la cascade d'activation pro-apoptotique mettant en place l'apoptose (voir point précédent). Dans ce cas-ci, l'activité kinase de RIP1 n'est pas requise. Cependant, lorsque l'apoptose est déficiente (caspases inhibées ou déficientes) ou quand les cellules sont infectées par certains virus exprimant des protéines anti-apoptotiques, la pro-caspase 8 n'est pas recrutée, ni activée, permettant ainsi à RIP1 cytosolique d'interagir avec RIP3 pour former le complexe IIb (= nécrosome), distinct des deux autres complexes qui induisent l'apoptose ou l'activation de la voie NF- κ B. Ce nécrosome permet la mise en place de la nécroptose et sa formation requiert l'activité kinase de RIP1. L'activité kinase de RIP3 est également impliquée dans cette mort cellulaire indépendante des caspases. RIP3 serait d'ailleurs un acteur clé dans le switch entre la voie nécroptique et celle de la survie ou de l'apoptose (**Figure 1.27**).

Plusieurs événements seraient à l'origine de la mise en place de la nécroptose. C'est notamment le cas pour la production de ROS, qui, dans certains types cellulaires sont produits lors de la stimulation au TNF- α . Les ROS agissent comme des oxydants qui sont nécessaires à la mise en place de la nécroptose. De plus, RIP3 interagit avec plusieurs enzymes métaboliques comme la glycogène phosphorylase (PYGL), la glutamate-ammonium ligase (GLUL) et la glutamate déshydrogénase 1 (GLUD1). L'activité kinase de RIP est requise afin d'augmenter les activités de ces trois enzymes. Ces enzymes augmentent la concentration en substrats utilisés dans la phosphorylation oxydative, qui est une source majeure de ROS dans la cellule. Cependant, le mécanisme par lequel ces enzymes et ce complexe IIb conduisent à la mort est encore méconnu (Christofferson et Yuan, 2010, Declercq et al., 2009, Tait et Green, 2008, Vandenabeele et al., 2008, Vandenabeele et al., 2010).

Ainsi, nous venons de montrer qu'il existe trois voies de mort cellulaire, l'apoptose, l'autophagie et la nécroptose. Ces voies sont impliquées dans la mort des cellules cancéreuses suite à une chimiothérapie. Depuis quelques années, il a été montré que certaines molécules modifiées et issues de l'alimentation pouvaient également induire la mort des cellules cancéreuses. C'est le cas, par exemple, de la pectine de citrus modifiée qui sera détaillée dans la suite de ce travail.

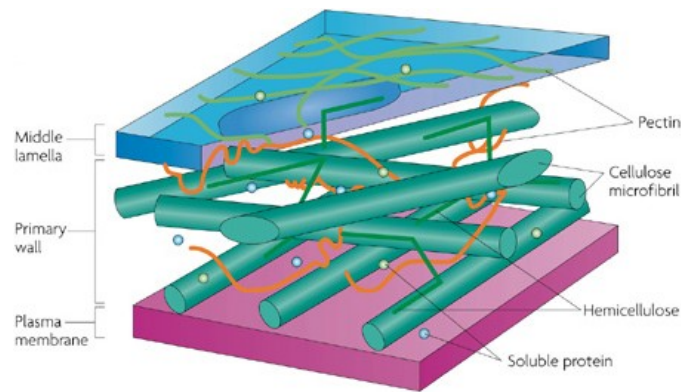


Figure 1.28 : La paroi des cellules végétales. Elle contient des microfibrilles de cellulose, de l'hémicellulose, de la pectine et des protéines solubles (Sticklen, 2008).

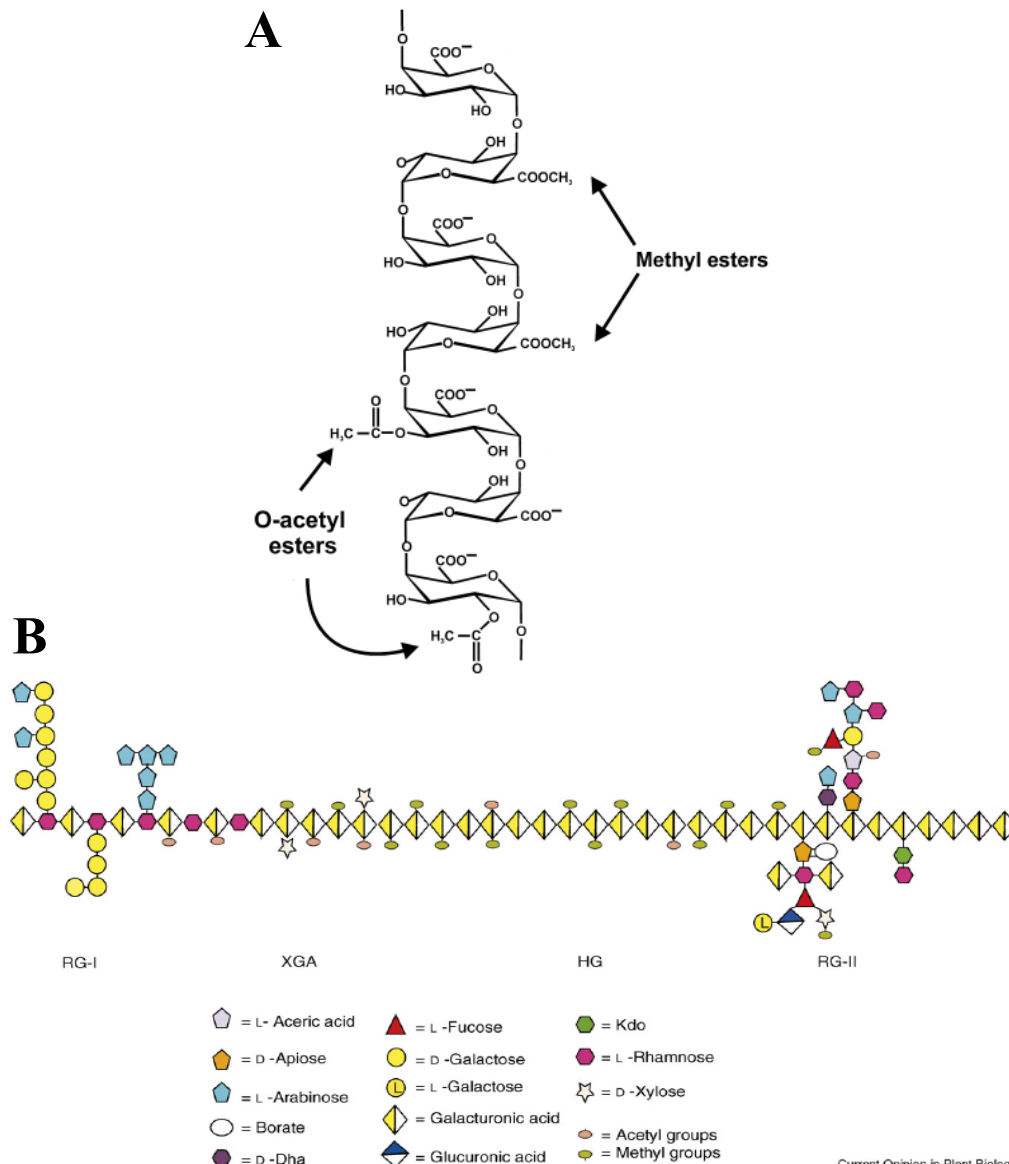


Figure 1.29 : La structure de la pectine. (A) L'homogalacturonan est un polymère linéaire d'acides galacturoniques lié en α -1, 4. Certains de ces résidus d'acide galacturonique sont méthylestérifiés ou estérifiés avec un acide acétique (Ridley, 2001). (B) La structure de la pectine se compose de quatre polysaccharides pectiques liés entre eux : l'homogalacturonan (HG), le rhamnogalacturonan I (RG-I), le rhamnogalacturonan-II (RG-II) et le xylogalacturonan (XG) (Mohnen, 2008).

1.3. La pectine

1.3.1. Généralités

Les pectines sont une famille de polysaccharides complexes présents dans les parois des cellules végétales des plantes supérieures (**Figure 1.28**) comme les fruits et les légumes, et principalement concentrées dans le zeste et la pulpe des agrumes (citrons, limes, oranges et pamplemousses) mais également dans les pommes et les prunes. Environ 4 à 5 grammes de pectine sont consommés chaque jour dans une alimentation occidentale normale. La pectine est très abondante dans les parois des cellules en croissance et en division. Elle est synthétisée au niveau de l'appareil de Golgi et transportée vers la paroi par des vésicules de sécrétion. Sa biosynthèse requiert au moins 67 transférases. Ce polysaccharide possède plusieurs rôles à la fois structuraux et fonctionnels, il est impliqué dans la croissance de la plante, dans sa morphologie, dans son développement, dans l'adhérence cellule-cellule, dans la défense, etc. Par ailleurs, il est utilisé comme agent gélifiant et stabilisant dans l'industrie cosmétique et alimentaire (confitures). Il est également à la base de nombreux films biodégradables, adhésifs, matériaux pour une implantation biomédicale et systèmes délivrant des médicaments comme c'est le cas pour des drogues anti-cancéreuses administrées par voie intraveineuse (Mohnen, 2008, Willats et al., 2006).

1.3.2. Structure de la pectine

Les pectines sont des polysaccharides riches en acides galacturoniques (GalA) liés de manière covalente en position *O*-1 et *O*-4. Ces GalA représentent environ 70% de la pectine. La pectine contient environ 300 à 1000 unités monosaccharidiques. Quatre familles principales de polysaccharides pectiques sont connues : les homogalacturonans (HG), les rhamnogalacturonans I (RG-I), les rhamnogalacturonans II (RG-II) et les xylogalacturonans (XG). Le squelette de GalA est présent dans tous ces polysaccharides pectiques. En fonction que ces polymères possèdent ou non des chaînes latérales de sucres neutres branchés, on distingue les régions lisses (HG et XG) et les régions hérissées (RG-I et RG-II). Il semblerait que ces polysaccharides soient liés entre eux par leur squelette d'HG mais peu est encore connu sur la structure de la pectine jusqu'à présent.

L'HG est le polysaccharide pectique le plus abondant, il représente 65% de la pectine. C'est un homopolymère linéaire d'acides galacturoniques liés en α -1, 4, qui est partiellement méthylestérifié au niveau des groupes carboxyles C6 et *O*-acétylé en *O*-2 ou *O*-3. Sa chaîne principale se compose parfois de plus de 100 GalA. Les autres polysaccharides pectiques sont des HG substitués et donc structurellement plus complexes.

Il existe deux types de rhamnogalacturonans, le RG-I et le RG-II, qui sont structurellement différents. Le RG-I représente 20 à 35% de la pectine. Il contient un squelette de répétitions de disaccharides $[\alpha\text{-D-GalA-1,2-}\alpha\text{-L-Rha-1-4-}]_n$ et les résidus rhamnose sont substitués par des chaînes linéaires ou branchées d'arabinans, de galactans ou d'arabinogalactans. Le squelette de GalA peut être acétylé en C-2 et/ou C-3. Tandis que le RG-II compose environ 10% de la pectine. Sa structure est conservée à travers les espèces de plantes et consiste à un squelette d'HG avec au moins (et probablement plus) 8 résidus α -D-GalA lié en 1,4 substitués d'au moins 12 types de sucres différents liés par 20 liaisons différentes. Ce polysaccharide pectique forme des dimères via une liaison ester-borate. Certaines mutations dans RG-II peuvent causer des modifications mineures à sa structure menant à une dimérisation diminuée et à des défauts de croissance, suggérant que les RG-II sont cruciaux pour la croissance et le développement normaux des plantes.

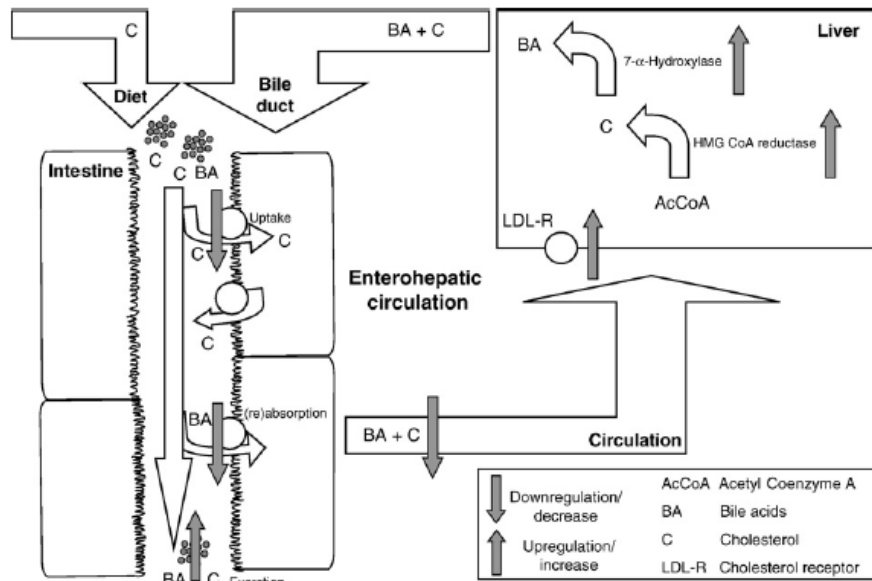


Figure 1.30 : Mécanisme postulé pour la diminution du cholestérol par les fibres solubles dans l'eau. Les fibres alimentaires solubles dans l'eau comme la pectine formeraient une épaisse couche d'eau dans la lumière intestinale, diminuant ainsi la (ré)absorption du cholestérol et des acides biliaires, menant à une augmentation de leur élimination fécale. Cela résulte au niveau hépatique en une augmentation de la conversion du cholestérol en acides biliaires, le pool hépatique de cholestérol libre diminue et la synthèse endogène de cholestérol augmente. En plus, l'expression des récepteurs au cholestérol LDL hépatique augmente afin de rétablir les stocks de cholestérol hépatique libre. Ces processus mènent à la diminution de la concentration sanguine en cholestérol associé aux LDL (Theuwissen et Mensink, 2008).

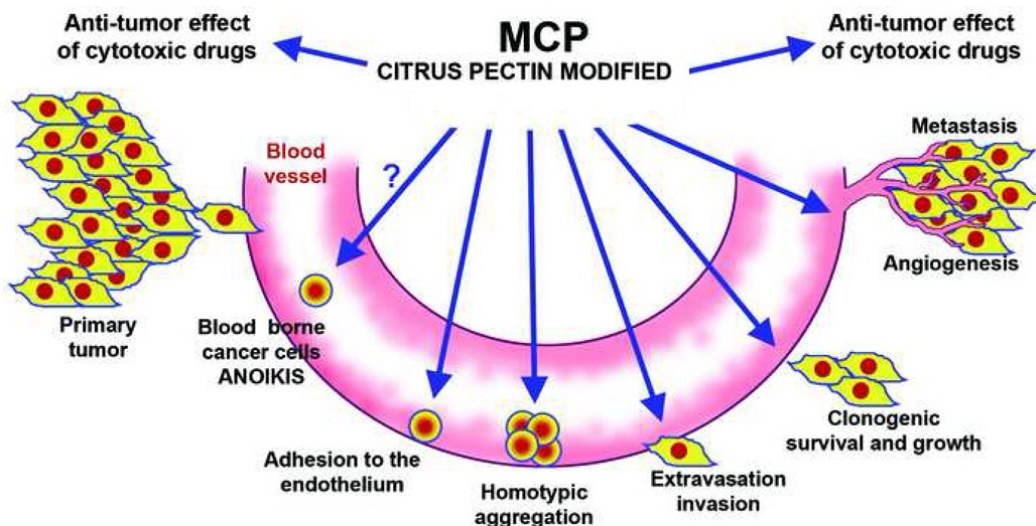


Figure 1.31 : Les effets de la pectine fragmentée sur les différentes étapes des métastases. La MCP inhibe l'anoïkose des cellules cancéreuses, leur adhérence à l'endothélium vasculaire, leur agrégation homotypique, leur extravasation, leur survie et leur croissance au niveau du nouveau site, ainsi que l'angiogénèse (Glinsky et Raz, 2009).

Le XG est un HG substitué en O-3 par un xylose. Il est surtout présent au niveau des tissus reproducteurs de la plante et joue un rôle dans la réponse à une attaque de pathogènes en rendant les HG plus résistants à la dégradation par les endopolygalacturonases produites pendant une attaque pathogène (**Figure 1.29**) (Harholt et al., 2010, Mohnen, 2008, Ridley et al., 2001, Willats et al., 2006).

1.3.3. La pectine et sa digestion

La pectine est une fibre alimentaire, ce qui signifie qu'elle est résistante à la digestion et à l'absorption dans l'intestin grêle et atteint donc le gros intestin. Les fibres alimentaires se divisent en deux branches, les insolubles dans l'eau et les solubles dans l'eau, c'est dans cette dernière catégorie que se classe la pectine. En effet, lors de la maturation des fruits et des légumes, la pectine se transforme d'une substance insoluble dans l'eau en une substance plus soluble (Theuwissen et Mensink, 2008). Selon Saito et al., la quantité de pectine présente dans l'iléum terminal de sujets humains sains représente 90% de la quantité ingérée. Cette concentration en pectine a été estimée en mesurant le taux d'acide galacturonique, issu du clivage protéolytique des HG. Les 10% manquants semblent s'expliquer par la dégradation de la pectine par des bactéries présentes dans l'iléum terminal (Saito et al., 2005). En effet, selon Nakajima et son équipe, cette décomposition se ferait, en conditions anaérobies, via des pectate lyases, présentes dans la bactérie *Clostridium butyricum-beijerinckii*, elle-même présente dans l'intestin humain. Ainsi, la bactérie contribuerait à la digestion des substances pectiques dites « non-digestibles ». Ces dernières seraient alors dégradées en acide digalacturonique qui fermenterait en acides gras de courte chaîne qui sont absorbés à travers la paroi intestinale et utilisés comme source d'énergie (Nakajima et al., 1999). Ainsi, environ 10% de la pectine ingérée sont dégradés en acides gras qui sont alors absorbés par les entérocytes au niveau de l'iléum terminal (**Figure 1.30**).

1.3.4. La pectine et ses effets bénéfiques

Comme cité ci-dessus, il a été montré, depuis longtemps, que certains aliments tels les agrumes amélioreraient la santé (Kushi et al., 2006). Il a aussi été montré que la pectine, présente notamment dans les agrumes, possédait de nombreuses propriétés promouvant la santé. Cependant, des effets différents ont été observés selon que la pectine soit entière ou fragmentée.

Lorsque la pectine est entière, elle est capable de réduire le taux de cholestérol des patients souffrant d'hypercholestérolémie (facteur de risque des maladies coronaires artérielles) en se liant au cholestérol. En effet, la pectine n'étant pas facilement absorbée par le flux sanguin, le cholestérol lié à la pectine est maintenu dans les intestins, favorisant son excrétion (Brown et al., 1999, Hexeberg et al., 1994, Theuwissen et Mensink, 2008).

Cependant, de nouvelles propriétés ont été observées lorsque la pectine est fragmentée en différents fragments, propriétés que ne possède pas la pectine intacte (**Figure 1.31**). C'est pourquoi les chercheurs ont mis au point divers processus afin de fragmenter la pectine. Ces altérations se font par des modifications de pH ou de température, ou par digestion enzymatique. Les longues chaînes branchées polysaccharidiques de pectine sont alors cassées en petites chaînes non branchées solubles qui se dissolvent plus facilement dans l'eau. Ce produit est appelé pectine fragmentée, une substance riche en résidus galactose et plus facilement traitée par le tractus digestif et absorbée par dans le flux sanguin que la pectine intacte. La pectine fragmentée par variations de pH est connue sous le nom de MCP (pH-modified citrus pectin, pectine de citrus modifiée par pH) tandis que celle fragmentée à la chaleur, HFCP (heat-fragmented citrus pectin, pectine de citrus fragmentée à la chaleur). Ces

deux sortes de pectine fragmentée possèdent des propriétés légèrement différentes comme nous le montrerons dans le point suivant (Glinsky et Raz, 2009, Kidd, 1996).

La MCP a démontré dans des études réalisées sur les animaux mais également chez l'homme plusieurs propriétés intéressantes. La première est son effet chélateur. En effet, les fragments augmentent significativement l'excrétion urinaire et fécale de métaux toxiques comme le plomb, qui perturbe de nombreux systèmes enzymatiques et affecte principalement le cerveau. Les fragments pectiques se lient à ces métaux dans le tractus digestif et le flux sanguin et les excrètent via les urines et les fèces, diminuant ainsi leur concentration plasmatique. L'intoxication au plomb est la maladie environnementale chronique la plus importante affectant les enfants de nos jours et ce, principalement dans les pays en voie de développement. Le traitement à la MCP possède de nombreux avantages par rapport aux thérapies par chélation traditionnelles qui présentent pas mal d'effets secondaires comme la perturbation de la concentration en minéraux essentiels tels que le calcium et le magnésium. La MCP ne perturbe pas ces concentrations. De plus, la thérapie par chélation traditionnelle se fait par voie intraveineuse tandis que la MCP se prend oralement. D'autres métaux que le plomb sont également excrétés de façon plus importante en présence de fragments pectiques comme le mercure, l'arsenic ou le cadmium (Zhao et al., 2008, Eliaz et al., 2006).

En plus d'extraire sélectivement les métaux toxiques, la MCP possède une affinité pour certains types de cellules cancéreuses *in vitro*. De façon intéressante, la MCP exerce des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses alors qu'elle n'en exerce pas sur les cellules non cancéreuses. Il semblerait que la MCP inhibe la croissance cellulaire via l'inhibition de la voie de pro-survie MAPK (mitogen-activated protein kinase) afin d'induire l'apoptose dépendante de la caspase-3 (Yan et Katz, 2010). Il semblerait également, selon Nangia-Makker et son équipe, que la MCP serait un inhibiteur de l'angiogenèse. En effet, la MCP empêche la migration et la formation de capillaires des cellules HUVECs (Nangia-Makker et al., 2002). Selon Inohara et Raz, la MCP diminuerait aussi les agrégations homotypique et hétérotypique, suggérant qu'elle prévient les métastases en perturbant les interactions cellules-cellules et cellules-MEC (Inohara et Raz, 1994). En 2005, Chauhan montre que la MCP induirait elle-même l'apoptose dans les cellules cancéreuses chimio-résistantes. Cette induction de l'apoptose dans les cellules d'un myélome multiple se ferait via la cascade de signalisation de la caspase 8 à la caspase 3 et en absence de changements dans le potentiel membranaire mitochondrial (via la voie intrinsèque) (Chauhan et al., 2005). Plus récemment, Streetly et son équipe ont aussi montré que la MCP modulait l'expression de protéines impliquées dans l'apoptose (Streetly et al., 2010).

In vivo, la MCP semble efficace pour bloquer les métastases de certains types de cancers tels que les mélanomes, les cancers de la prostate, du colon et du sein. Ces fragments pourraient donc être efficaces dans le traitement et la prévention des cancers métastatiques. Quelques exemples d'études réalisées sont explicités ci-dessous. Nangia-Makker et al. ont observé que des souris ayant bu de l'eau contenant la MCP présentent une réduction du volume des tumeurs implantées du colon et du sein par rapport aux souris ayant bu de l'eau seule. De plus, les métastases pulmonaires, hépatiques ou ganglionnaires sont également inhibées. Cette inhibition de métastases se ferait via l'inhibition de l'angiogenèse car ces chercheurs observent une réduction de densité des vaisseaux sanguins associés aux tumeurs (Nangia-Makker et al., 2002). Plus récemment, Liu et al. ont montré que la MCP inhibait aussi la croissance et les métastases de manière dépendante de la dose dans un modèle de souris de cancer du colon (Liu et al., 2008). Cette réduction de la taille tumorale de ce type de cancer est également montrée par Hayashi (Hayashi et al., 2000).

Certaines études ont également été réalisées chez l'homme. En effet, en 1999, les effets de la MCP ont été examinés chez des hommes atteints d'un cancer de la prostate. Quinze grammes du traitement MCP appelé Pectasol[®] ont été administrés quotidiennement

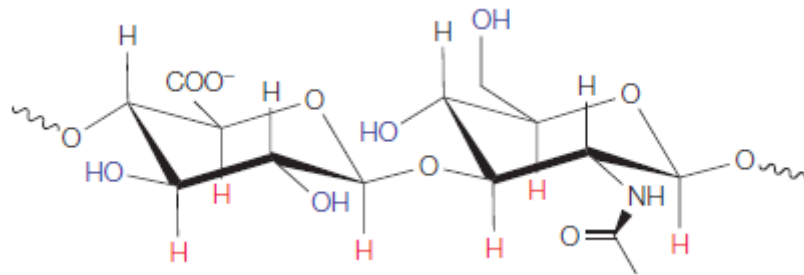


Figure 1.32 : Structure de l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycan composé d'unités disaccharidiques polymériques répétées d'acide D-glucuronique et de N-acétyl D-glucosamine liées par un lien glucuronique β (1 \rightarrow 3) (Toole, 2004).

chez sept hommes. Le temps de doublement de la quantité circulante de l'hormone PSA (prostate specific antigen) était plus long et les taux sanguins de PSA étaient diminués (Strum et al., 1999). Quelques années plus tard, une étude similaire à cette dernière a été réalisée et a donné les mêmes résultats (Guess et al., 2003). Ainsi, la MCP ralentit la vitesse à laquelle le cancer se développe ou se propage, résultant en une prolongation de la vie du patient. Jusqu'à présent, peu d'effets secondaires ont été relatés dans la littérature scientifique.

Comme mentionné ci-dessus, la pectine peut également être fragmentée via la chaleur. En 2007, une étude menée par Jackson montre l'effet de la pectine de citrus fragmentée à la chaleur (HFCP) sur l'induction de l'apoptose dans des cellules LNCaP (cancer humain de la prostate). Les auteurs montrent que l'HFCP induit l'apoptose à un niveau 40 fois supérieur par rapport à des cellules non traitées. Ainsi, les auteurs concluent que des éléments structuraux spécifiques présents dans la pectine de citrus sont responsables de l'activité apoptotique, et cette structure est générée ou enrichie par le traitement à la chaleur (Jackson et al., 2007).

Ainsi, diverses études ont montré une efficacité de la pectine de citrus fragmentée (MCP et HFCP), principalement en matière de cytotoxicité dans les cellules cancéreuses et d'inhibition des métastases dans les modèles in vivo.

1.4. Les quatre récepteurs candidats

1.4.1. Mise en contexte

Comme vu ci-dessus, la pectine de citrus fragmentée tue les cellules cancéreuses. Cependant, ni le mécanisme, ni la voie par laquelle cela se passe ne sont encore connus. Dans ce travail, nous avons étudié quatre récepteurs candidats afin de déterminer s'ils jouaient un rôle dans la reconnaissance des fragments pectiques obtenus par fragmentation à la chaleur. Ces récepteurs sont la Galectine-3, le CD44, le CD168 et le TLR-4. La galectine-3 est connue pour reconnaître la MCP, tandis que les trois autres récepteurs sont connus pour reconnaître des polysaccharides comme l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique ou hyaluronan (HA), un composant majeur de la MEC, est un glycosaminoglycan composé d'unités disaccharidiques polymériques répétées d'acide D-glucuronique et de N-acétyl D-glucosamine liées par un lien glucuronique β (1 \rightarrow 3) de plus de 1000 kDa dans sa forme native (**Figure 1.32**). Ce polymère soluble possède plusieurs fonctions telles que la lubrification des articulations, le remplissage des espaces intercellulaires et l'apport d'une matrice où les cellules peuvent migrer. Il est produit par de nombreux types cellulaires et principalement par les cellules mésenchymateuses, notamment durant une blessure et une réparation tissulaires. Ainsi, il peut réguler l'activation des cellules inflammatoires et le comportement des cellules épithéliales et des fibroblastes. L'HA existe principalement sous forme soluble dans la MEC mais il peut également se lier à des protéines telles que CD44 ou CD168 et influencer leurs fonctions (Noble et al., 2011, Toole, 2004).

La pectine étant un polysaccharide composé principalement d'acide galacturonique, ces récepteurs semblent donc être de bons candidats potentiels.

1.4.2. La Galectine-3

La galectine-3 est une protéine faisant partie de la famille des lectines qui sont des protéines liant les carbohydrates. Les lectines regroupent plusieurs sous-familles dont les galectines qui sont les plus étudiées. Les galectines sont définies par une séquence de 130 acides aminés conservée à travers l'évolution (domaine de reconnaissance et de liaison des carbohydrates, CRD) et leur capacité à reconnaître des structures β -galactoside. Jusqu'à

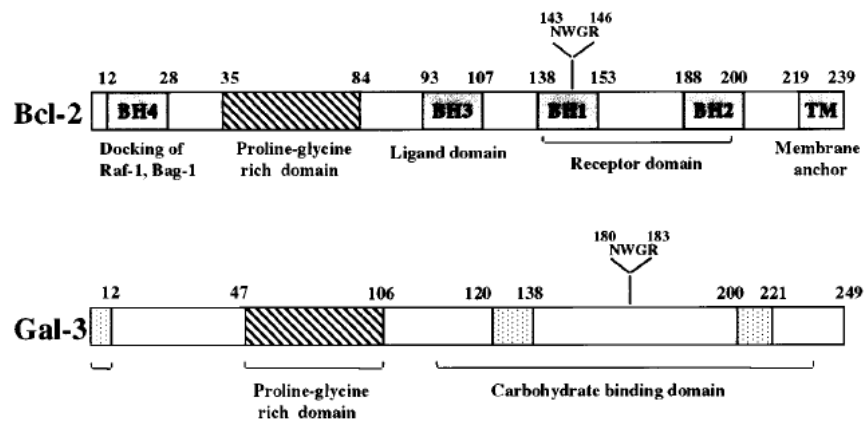


Figure 1.33 : Le motif NWGR dans les protéines Bcl-2 et Gal-3. Bien que Gal-3 partage le domaine anti-mort NWGR avec la famille BCL-2, elle n'en est pas un membre (Kim et al., 1999).

présent, 15 galectines mammaliennes ont été identifiées. Sur base du nombre et de l'organisation des CRDs, les galectines ont été subdivisées en trois groupes : le groupe prototype (un seul CRD), le groupe chimère (un seul CRD lié à un domaine N-terminal riche en glycine et en proline) et le groupe des répétitions en tandem (deux CRDs). Les membres ayant un seul CRD sont capables de former des dimères ou des oligomères, qui sont cruciaux pour certaines de leurs fonctions biologiques. Les galectines sont présentes dans le cytoplasme, dans le noyau, à la surface cellulaire et dans la MEC. Le membre le plus étudié des galectines est la galectine-3 (Gal-3), sur laquelle nous allons nous attarder (Newlaczyl et Yu, 2011, Dumic et al., 2006, Liu et Rabinovich, 2005, Barondes et al., 1994, Yang et Liu, 2003).

Gal-3, une protéine de 29 à 35 kDa, représente l'unique membre du groupe chimère. Gal-3 est composé de trois domaines structuraux, chacun associé avec au moins une fonction : (1) un domaine amino-terminal contenant le site de phosphorylation sérine qui est important pour la régulation de sa signalisation cellulaire, (2) une séquence collagène- α -like qui peut être clivée par certaines métalloprotéinases de matrice (MMPs) et (3) le domaine carboxy-terminal qui contient le CRD et le motif anti-mort NWGR (Asp-Trp-Gly-Arg). Malgré que Gal-3 partage le domaine anti-mort NWGR avec la famille BCL-2, elle n'en est pas un membre (**Figure 1.33**) (Newlaczyl et Yu, 2011, Dumic et al., 2006, Liu et Rabinovich, 2005, Akahani et al., 1997, Yang et Liu, 2003).

Gal-3 se lie plus fermement à des glycanes qui se finissent par un galactose qu'à du simple galactose. Le ligand préférentiel de Gal-3 est la N-acétyllactosamine. Gal-3 joue de nombreux rôles biologiques notamment dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie et la mort (forme cytoplasmique) mais également dans la régulation de la transcription génique (forme nucléaire). Gal-3 intervient aussi dans l'adhérence et la signalisation cellulaire, la maintenance de l'homéostasie cellulaire, la chémoattraction, les réactions immunitaires, l'angiogenèse, l'invasion tumorale et les métastases (formes membranaire et extracellulaire) (Newlaczyl et Yu, 2011, Dumic et al., 2006, Liu et Rabinovich, 2005, Barondes et al., 1994).

L'interaction entre la Gal-3 membranaire et ses ligands (laminine, fibronectine, intégrines, etc.) se fait d'une manière dépendante du carbohydrate et s'accompagne d'un changement conformationnel, permettant la mise en place de cascades de transduction du signal qui, à leur tour induisent de nombreuses réactions biochimiques. Au niveau cytoplasmique, Gal-3 interagit avec des protéines intracellulaires comme Akt, Bcl-2, K-Ras, cycline A et E, etc. via des interactions protéine-protéine d'une manière indépendante du carbohydrate (Newlaczyl et Yu, 2011, Dumic et al., 2006, Liu et Rabinovich, 2005, Hughes, 2001).

Bien que la Gal-3 soit présente dans de nombreux tissus adultes humains, elle est surtout exprimée par les cellules épithéliales et immunitaires. Des changements dans son expression sont souvent observés dans les tumeurs, suggérant son rôle dans divers processus contribuant à la tumorigenèse. En effet, son intensité d'expression dépend de la progression tumorale et du potentiel d'envahissement et métastatique. En effet, Gal-3 est surexprimé dans les cellules métastatiques par rapport aux cellules de la tumeur primaire (Danguy et al., 2002, Newlaczyl et Yu, 2011, Dumic et al., 2006, Liu et Rabinovich, 2005, Johnson et al., 2007, Nangia-Makker et al., 2008, Satelli et al., 2008, Yang et Liu, 2003). Il existe différents mécanismes favorisant la tumorigenèse via Gal-3, nous allons les illustrer par quatre exemples. Il semblerait que Gal-3 participe à la transformation des cellules grâce à son interaction avec l'oncogène K-Ras, qui est alors constitutivement activé. Gal-3 cytoplasmique empêche également la mise en place de l'apoptose en se liant avec Bcl-2 et en bloquant la MOMP et la libération du cytochrome c (Newlaczyl et Yu, 2011, Dumic et al., 2006, Liu et Rabinovich, 2005, Nakahara et al., 2005, Nangia-Makker et al., 2007, Nangia-Makker et al.,

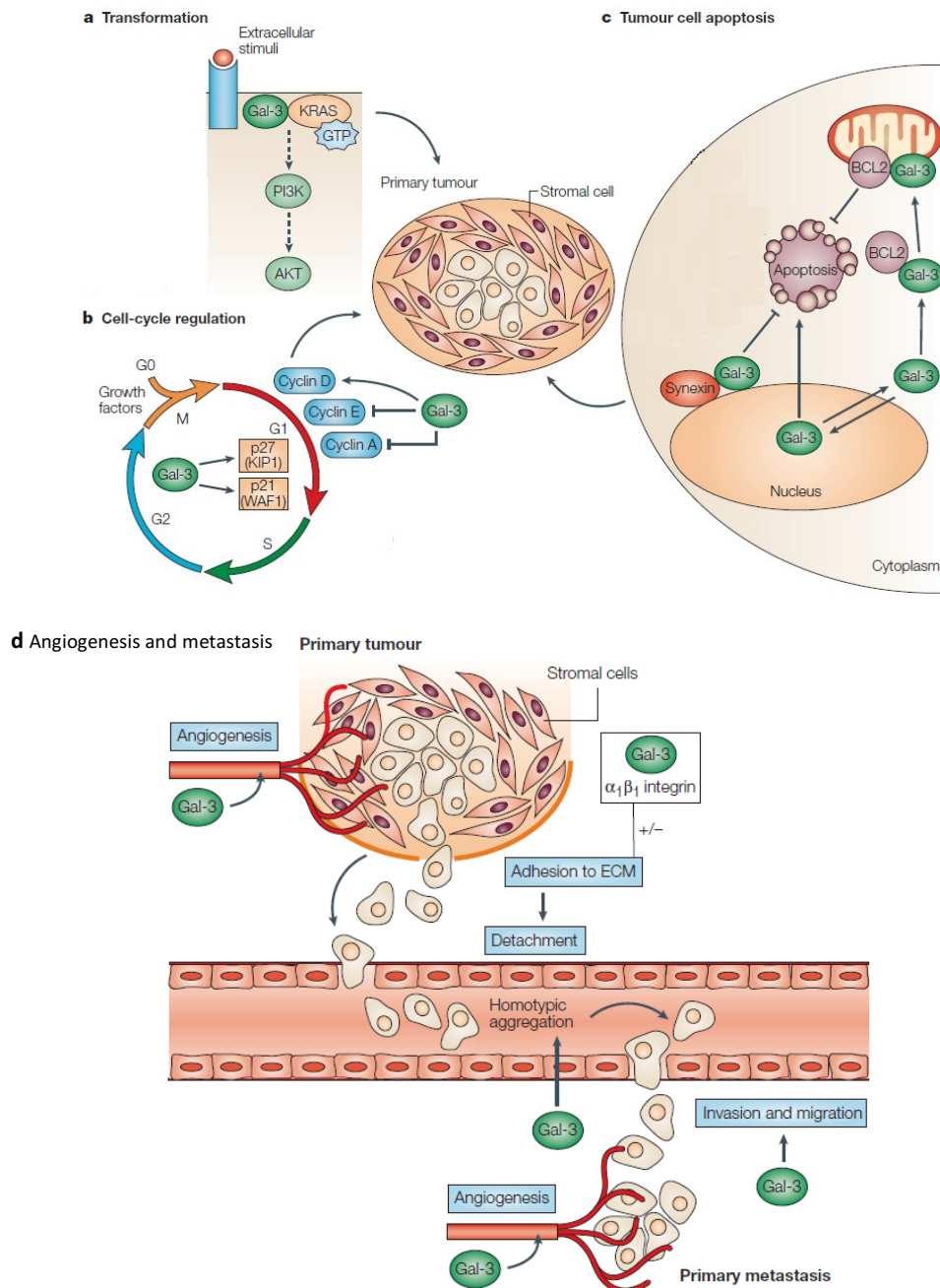


Figure 1.34 : Rôles de Gal-3 dans la progression tumorale. (A) Gal-3 interagit avec des oncogènes comme Ras et active alors la voie de transduction du signal. (B) Gal-3 régule les niveaux des régulateurs et des inhibiteurs du cycle cellulaire, résultant en l'arrêt du cycle cellulaire. (C) Gal-3 possède des fonctions anti-apoptotiques et transloque vers la membrane périnucléaire et la mitochondrie. La translocation est dépendante de la synexine, une protéine de liaison des phospholipides et du Ca^{2+} . L'effet de Gal-3 dans la régulation de l'apoptose dépend de sa localisation subcellulaire : la Gal-3 cytoplasmique est anti-apoptotique tandis que la Gal-3 nucléaire est pro-apoptotique. (D) La progression d'une tumeur primaire en tumeur métastatique est un processus multistep qui implique des interactions cellule-cellule et cellule-MEC, l'invasion cellulaire et/ou la migration et l'angiogénèse. Gal-3 joue également un rôle dans ce phénomène Gal-3 interagit avec des intégrines pour médier l'adhérence homotypique et hétérotypique mais peut aussi inhiber cette adhérence pour permettre le détachement des cellules tumorales. Gal-3 favorise aussi l'angiogénèse en promouvant la migration des cellules endothéliales (Liu et Rabinovich, 2005).

2008, Yang et Liu, 2003, Yu et al., 2002). Il est également connu que Gal-3 régule les activités du système immunitaire et contribue à l'immunosuppression favorisant la tumorigenèse (Henderson et Sethi, 2009, Newlaczyk et Yu, 2011, Dunic et al., 2006, Liu et Rabinovich, 2005). De plus, Gal-3 est connue pour augmenter la motilité des cellules endothéliales *in vitro* et promeut la formation de nouveaux capillaires *in vivo*, permettant ainsi à l'angiogenèse de se mettre en place (Nangia-Makker et al., 2000, Newlaczyk et Yu, 2011, Dunic et al., 2006, Liu et Rabinovich, 2005, Nangia-Makker et al., 2008). Il semblerait aussi que la Gal-3 membranaire médie l'adhérence cellulaire homotypique, agrégeant les cellules tumorales dans la circulation durant les métastases et médiant aussi l'adhérence cellulaire hétérotypique afin de permettre l'adhérence des cellules métastatiques à l'endothélium vasculaire (**Figure 1.34**) (Newlaczyk et Yu, 2011, Dunic et al., 2006, Liu et Rabinovich, 2005, Nangia-Makker et al., 2008).

Il a été montré que la MCP agissait comme ligand antagoniste de la Gal-3, bloquant ainsi ses diverses fonctions (Gunning et al., 2009, Inohara et Raz, 1994, Sathisha et al., 2007). Comme mentionné ci-dessus, lors des métastases, Gal-3 agglutine les cellules cancéreuses véhiculées par le sang afin qu'elles survivent à l'apoptose associée avec la perte d'ancrage (anoïkose) et à la circulation sanguine. Le traitement à la MCP pourrait réduire cet effet de Gal-3 mais aucune étude n'a encore été réalisée pour le vérifier. De plus, Gal-3 joue un rôle dans l'adhérence hétérotypique et homotypique. Le traitement à la MCP semble inhiber ces deux types d'adhérence et donc l'invasion tumorale. Gal-3 protège également les cellules de l'apoptose (principalement la forme mitochondriale). Ainsi, inhiber Gal-3 par MCP résulte en une diminution de leur survie et une augmentation de l'apoptose. De plus, de façon intéressante, Gal-3 régule la sensibilité des cellules cancéreuses à de nombreux agents chimiothérapeutiques, comme l'étoposide entre autres, les rendant résistantes à ces traitements. Ainsi, en inhibant cette protéine par la MCP, les cellules cancéreuses deviendraient moins résistantes à ces traitements chimiothérapeutiques et donc plus sensibles (Glinsky et Raz, 2009, Nangia-Makker et al., 2002, Kidd, 1996, Inohara et Raz, 1994, Takenaka et al., 2004).

Cependant, bien que l'inhibition des métastases et la cytotoxicité cellulaire soient dépendantes de la Gal-3 lors du traitement à la MCP, il semble que ce ne soit pas le cas lorsque la pectine est fragmentée à la chaleur. En effet, les cellules LNCap utilisées dans l'étude de Jackson n'expriment pas cette lectine, suggérant que les effets apoptotiques de la HFCP sont médiés par des mécanismes indépendants de la Gal-3 (Jackson et al., 2007). Ainsi, d'autres récepteurs seraient impliqués dans la reconnaissance des fragments pectiques, c'est pourquoi nous en avons sélectionné trois autres dont les fonctions étaient intéressantes. En effet, le CD44, le CD168 et le TLR-4 sont tous capables de reconnaître des polysaccharides comme l'acide hyaluronique. Nous allons les détailler ci-dessous.

1.4.3. Le récepteur CD44

Le récepteur CD44 fait partie de la famille des CAMs (cell adhesion molecules) tout comme les sélectines, les intégrines et les cadhérines. Les CAMs contrôlent le comportement cellulaire en ayant un rôle dans l'adhérence cellule-cellule et cellule-MEC et sont, pour cela, essentielles dans la maintenance de l'intégrité tissulaire. Le récepteur CD44 est une glycoprotéine intégrale membranaire composée d'un domaine cytoplasmique, d'un domaine transmembranaire et de sept domaines extracellulaires. La queue cytoplasmique se lie aux protéines ankyrine et ERM (ezrin-radixin-moesin), qui fournissent un lien avec le cytosquelette (actine). Le domaine extracellulaire sert à interagir avec ses différents ligands. Cette protéine est encodée par un gène unique mais de multiples formes de CD44 sont générées, résultant d'un épissage alternatif. Ce dernier se produit dans le domaine

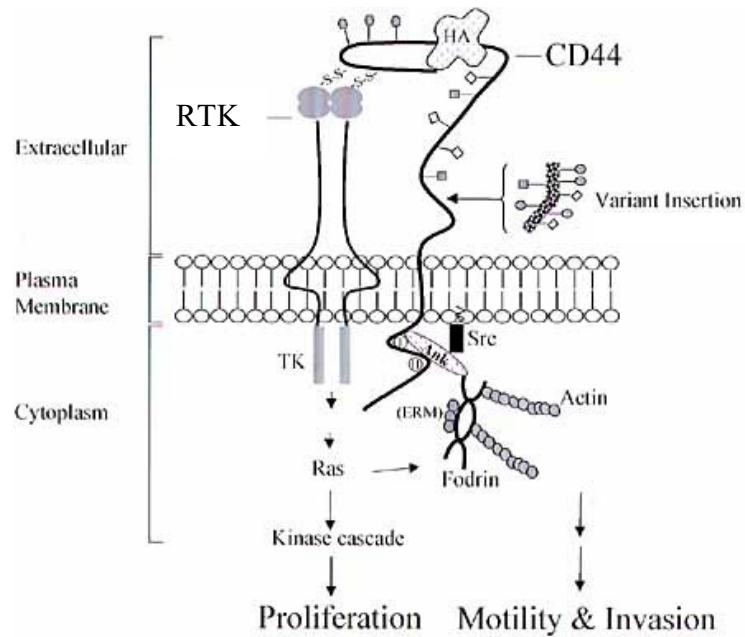


Figure 1.35 : Le récepteur CD44 et son rôle dans la tumorigenèse. Le CD44 est encodé par un gène unique mais de multiples formes de CD44 sont générées, résultant d'un épissage alternatif. L'isoforme standard (CD44s) est la plus petite forme et est exprimée à la surface de la plupart des cellules normales mais également des cellules cancéreuses. Les variants (CD44v 1-10) sont exprimés principalement par les cellules cancéreuses. La liaison de l'HA au domaine extracellulaire du CD44 promeut l'interaction entre CD44 et les protéines du cytosquelette (ankyrine et protéines ERM). Ces protéines peuvent lier l'actine permettant ainsi la motilité cellulaire et l'invasion. CD44 se lie aussi aux récepteurs à activité tyrosine kinase menant à l'activation de Ras et de la cascade des kinases, permettant ainsi la prolifération cellulaire et donc la croissance tumorale (Bourguignon et al., 1998).

extracellulaire générant ainsi divers variants dont les poids moléculaires varient de 85 à 200 kDa. L'isoforme standard (CD44s) est la plus petite et est exprimée à la surface de la plupart des cellules normales mais également des cellules cancéreuses. Les variants (CD44v 1-10) sont exprimés principalement par les cellules cancéreuses (Misra et al., 2011, Zöller, 2011, Orian-Rousseau, 2010, Slevin et al., 2007, Hertweck et al., 2011, Rudzki et Jothy, 1997, Turley et al., 2002, Goodison et al., 1999, Bourguignon et al., 1998, Ponta et al., 2003).

CD44 représente le principal récepteur de l'HA (le lie et l'internalise) mais peut aussi interagir avec d'autres molécules comme le collagène, la fibronectine, l'ostéopontine, des facteurs de croissance et des MMPs. Ainsi, les multiples fonctions de CD44 dépendent de son association avec ses protéines partenaires qui régulent la migration, la croissance, la différenciation et la survie cellulaires mais également l'inflammation, le recrutement et l'activation des lymphocytes T. Au niveau d'une tumeur, une corrélation est observée entre la MEC riche en HA et l'expression de CD44s et de CD44v. En effet, ces récepteurs sont surexprimés dans les cellules tumorales. L'HA en se liant au CD44 (surtout CD44v) promeut la croissance tumorale et le potentiel métastatique. Les cellules cancéreuses peuvent alors migrer et envahir les membranes basales et la MEC afin de s'installer dans un site distant. Pour se faire, la liaison de l'HA au CD44 initie des signaux qui promeuvent la survie cellulaire en inhibant l'apoptose et recrute la MMP9 afin de dégrader la MEC. Son effet anti-apoptotique se ferait via les voies PI3K/Akt et MAPK (**Figure 1.35**). De plus, cette liaison permet aussi la maturation de la forme latente du TGF- β , favorisant la néovascularisation de la tumeur (Misra et al., 2011, Zöller, 2011, Orian-Rousseau, 2010, Hamilton et al., 2007, Slevin et al., 2007, Hertweck et al., 2011, Noble et al., 2011, Rudzki et Jothy, 1997, Turley et al., 2002, Goodison et al., 1999, Bourguignon et al., 1998, Ponta et al., 2003). Ainsi, l'augmentation d'expression de CD44 serait corrélée avec un mauvais pronostic. Néanmoins, dans un nombre limité de tumeurs, il semblerait que ce soit la diminution d'expression de CD44 qui soit corrélée avec l'agressivité (Misra et al., 2011, Zöller, 2011, Abetamann et al., 1996).

De façon intéressante, les isoformes contenant l'exon v6 sembleraient être des cibles appropriées pour une thérapie anti-cancéreuse. D'ailleurs, des études cliniques sont en cours pour le bivatuzumab, qui est un anticorps monoclonal humanisé anti-CD44v6 marqué au rhénium-186, chez des patients souffrant de HNSCC (carcinome cellulaire squameux tête et cou). Ces anticorps radiomarqués montrent des effets anticancéreux prometteurs maintenant stable la maladie et ce, avec peu de toxicité. Cependant, une limitation a été mise en évidence : l'anticorps s'accumule dans des régions non tumorales. Par ailleurs, une nouvelle stratégie a été développée en utilisant le bivatuzumab couplé de manière covalente à une drogue cytotoxique non-radioactive, le bivatuzumab mertansine. La mertansine est un agent toxique bloquant les microtubules. Les patients ayant un HNSCC avancé montrent une stabilisation de la maladie et une régression de la tumeur. Cependant, la mort d'un patient suite à des effets non désirés a stoppé le développement de cette drogue (Misra et al., 2011, Orian-Rousseau, 2010, Sauter et al., 2007).

1.4.4. Le récepteur CD168

Le récepteur CD168, aussi connu sous le nom de récepteur de motilité médié par l'hyaluronan (RHAMM), fait partie de la famille MAP (microtubule-associated protein). Le CD168 est une protéine périphérique qui ne possède pas de domaine transmembranaire hydrophobe. Par ailleurs, comme le récepteur CD44, CD168 est sujet à de nombreux épissages alternatifs. Cette protéine se situe en membrane plasmique mais également dans le cytoplasme et le noyau. Selon sa localisation, elle possède des fonctions distinctes. Au niveau nucléaire, elle interagit avec les centrosomes ou le fuseau mitotique et est exprimé d'une

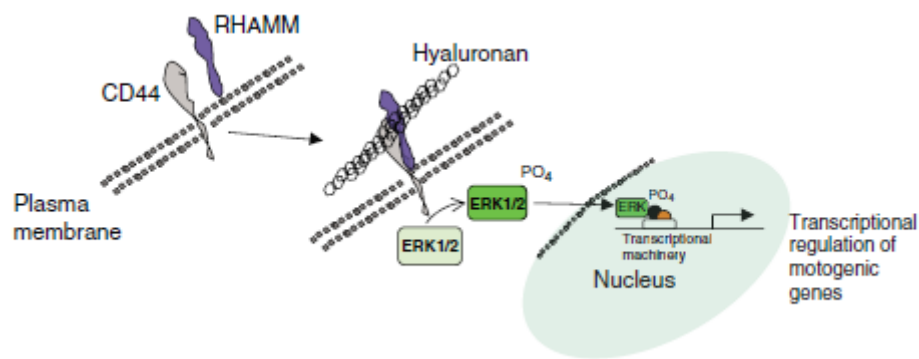


Figure 1.36 : Le récepteur CD168. CD168 est une protéine périphérique, liée à une protéine transmembranaire, comme CD44 qui permet son ancrage. Après reconnaissance d'un ligand, une interaction fonctionnelle et physique entre CD44 et CD168 en surface cellulaire se produit, activant des cascades de kinases intracellulaires comme la voie Ras/ERK 1, 2 kinase. Cela permet alors la migration cellulaire et la prolifération cellulaire dans les cellules normales et cancéreuses (Maxwell et al., 2008).

manière dépendante du cycle cellulaire. RHAMM module donc le contrôle du cycle cellulaire en stabilisant la formation du fuseau mitotique. Lorsque CD168 est en membrane, son rôle principal est la reconnaissance de l'HA, médiant la motilité cellulaire et jouant également un rôle dans les blessures et la réparation tissulaire (Hamilton et al., 2007, Maxwell et al., 2008, Noble et al., 2011, Slevin et al. 2007, Turley et al., 2002).

RHAMM se trouve à la surface cellulaire de plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales. Etant une protéine périphérique, CD168 est lié à une protéine transmembranaire, comme CD44 qui permet alors son ancrage. Après reconnaissance d'un ligand, une interaction fonctionnelle et physique entre CD44 et CD168 en surface cellulaire se produit, activant des cascades de kinases intracellulaires. En effet, la voie Ras/ERK 1, 2 kinase est activée, permettant alors la migration cellulaire suite à la formation de microfilaments et, la prolifération cellulaire dans les cellules normales et cancéreuses (**Figure 1.36**) (Hamilton et al., 2007, Maxwell et al., 2008, Noble et al., 2011, Slevin et al. 2007, Turley et al., 2002, Tzankov et al., 2011).

Les niveaux d'ARNm et protéique de CD168 extracellulaire et nucléaire sont très faibles dans les cellules normales mais augmentent durant la progression métastatique d'une grande variété de tumeurs (cancer du sein, de la prostate, de la vessie, endométrial, gastrique, gliome malin, ...). En effet, lorsque RHAMM est hyperexprimé, le pronostic clinique est mauvais, il est donc considéré comme « oncogène », tout comme CD44. Lorsque RHAMM est extracellulaire, il contribue, seul ou en complexe avec CD44, au potentiel invasif des cellules cancéreuses en inhibant l'apoptose (Abetamann et al., 1996, Gust et al., 2009, Ishigami et al., 2011, Noble et al., 2011, Slevin et al. 2007, Tzankov et al., 2011, Wang et al., 1998). Tandis que lorsque RHAMM est nucléaire, il peut également affecter la transformation cellulaire et la progression tumorale en promouvant l'instabilité génomique (amplification du centrosome ou aberrations du fuseau mitotique) (Maxwell et al., 2008).

1.4.5. Le récepteur TLR-4

Le récepteur TLR-4 fait partie de la famille des récepteurs Toll-like (TLR) qui sont la classe principale des PPRs (pattern-recognition receptors). Les TLRs sont les principaux composants du système immunitaire inné, reconnaissant les patterns moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), qui sont essentiels pour la survie du pathogène (acides nucléiques, composants de l'enveloppe bactérienne, etc). Cette reconnaissance initie alors une puissante réaction inflammatoire. En plus d'avoir un rôle dans l'immunité, les TLRs jouent également un rôle dans la régénération et la réparation des tissus. Les TLRs sont une famille de récepteurs transmembranaires, exprimés d'un grand nombre de cellules immunitaires comme les cellules NK, les monocytes, les cellules dendritiques et à des niveaux plus faibles dans les cellules respiratoires humaines ainsi que les cellules épithéliales. Certains TLRs sont exprimés en surface cellulaire tandis que d'autre restent séquestrés dans des compartiments intracellulaires (endosomes, RE, lysosome). La famille des TLRs humains comprend 11 membres dont chacun possède un domaine amino-terminal responsable de la reconnaissance des ligands (spécifiques à chaque TLR), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique jouant un rôle dans la transduction du signal (Wolska et al., 2008, Chang, 2010, Ioannou et Voulgarelis, 2010, Kutikhin, 2011, Rakoff-Nahoum et Medzhitov, 2009, So et Ouchi, 2010).

Nous nous sommes focalisés sur un membre de cette famille, le TLR-4. Ce récepteur, présent en surface cellulaire, reconnaît soit des ligands exogènes (lipopolysaccharide (LPS)), soit des ligands endogènes (protéines de choc thermique, composants de la MEC comme le fibrinogène, la fibronectine, l'HA, etc). Ainsi, TLR-4 peut activer la réponse immunitaire en absence de microbes étrangers, comme lors de dommages cellulaires par exemple. Il est

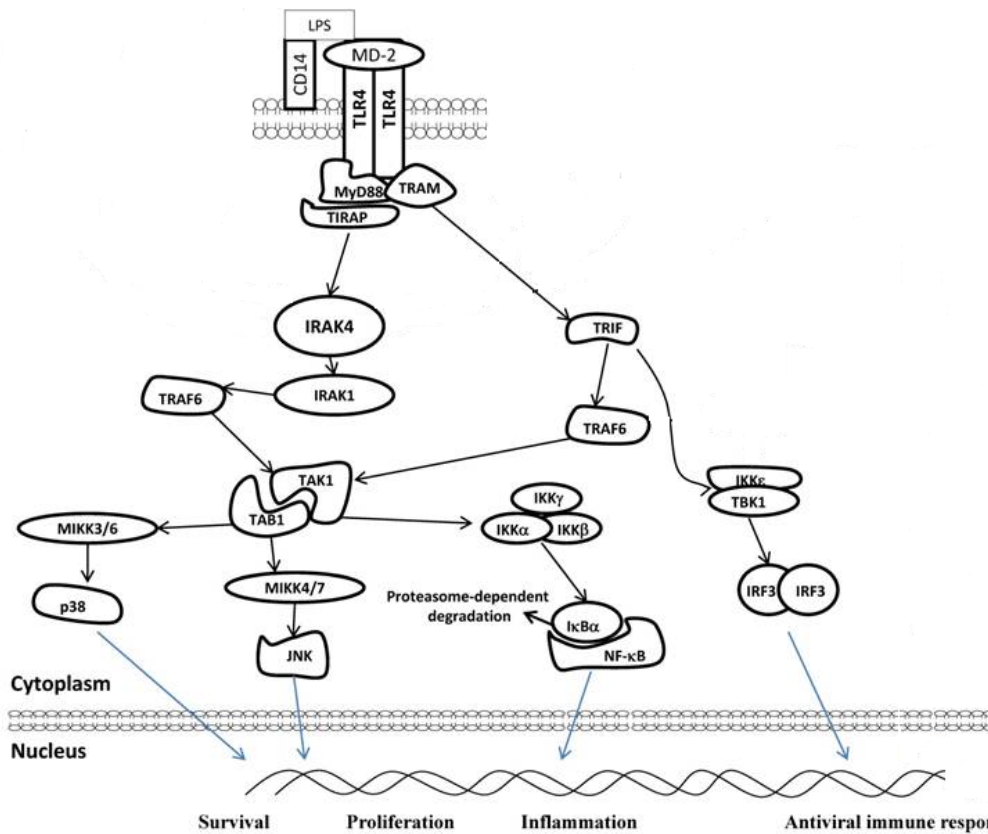


Figure 1.37 : Le récepteur TLR-4. Lors de la stimulation par un ligand (LPS, par exemple), le TLR-4 se dimérise, subit un changement conformationnel et lie différentes protéines telles que CD14 et MD-2 afin de former un complexe ligand/MD-2/TLR-4. Ces protéines recrutent quatre protéines adaptatrices : MyD88, TIRAP, TRIF et TRAM, permettant ainsi d'activer les voies de NF-κB, des MAPK et du facteur régulateur de l'interféron (IRF). Ainsi, des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNFα, etc), des chémokines (IL-8, etc) et de l'interféron α et β sont produites et l'inflammation prend place. (So et Ouchi, 2010).

intéressant de noter que l'HA est aussi un composant de l'enveloppe de certaines bactéries. En absence de pathogène, l'HA endogène induit la maturation des cellules dendritiques en cellules APC (antigen-presenting cells) afin de promouvoir la réponse inflammatoire (Wolska et al., 2008, Chang, 2010, Kutikhin, 2011, Rakoff-Nahoum et Medzhitov, 2009, So et Ouchi, 2010, Noble et al., 2011).

Lorsqu'il y a stimulation par un ligand du TLR-4, le récepteur se dimérise, subit un changement conformationnel et lie différentes protéines telles que CD14 et MD-2 (myeloid differentiation protein-2) afin de former un complexe ligand/MD-2/TLR-4. Ces protéines recrutent quatre protéines adaptatrices : MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TIRAP (toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein), TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β) et TRAM (TRIF-related adaptor molecule), permettant ainsi d'activer les voies de NF- κ B, des MAPK et du facteur régulateur de l'interféron (IRF). Ainsi, des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α , etc), des chémokines (IL-8, etc) et de l'interféron α et β sont produites et l'inflammation prend place (**Figure 1.37**) (Wolska et al., 2008, Chang, 2010, Kutikhin, 2011, Rakoff-Nahoum et Medzhitov, 2009, So et Ouchi, 2010, Noble et al., 2011, Ioannou et Voulgarelis, 2010, Verstrepen et al., 2008).

Comme vu au point 1.1.3.h, l'inflammation chronique ou récurrente joue un rôle clé dans le développement du cancer en promouvant la prolifération cellulaire via la voie NF- κ B. De plus, de manière intéressante, l'expression du TLR-4 semble augmenter dans les lignées cellulaires des carcinomes pulmonaires (Zhang et al., 2009). Cela s'est aussi démontré dans d'autres tumeurs (Zhang et al., 2010, González-Reyes et al., 2011, Kelly et al., 2006, Fukata et al., 2007, Yang et al., 2010, Cammarota et al., 2010, So et Ouchi, 2010, Rakoff-Nahoum et Medzhitov, 2009, Stark et al., 2009). Ainsi, la surexpression de TLR-4 est bénéfique pour la tumeur en promouvant la survie cellulaire. En effet, l'expression de protéines anti-apoptotiques est augmentée via l'activation de la voie NF- κ B, inhibant ainsi l'apoptose (Ioannou et Voulgarelis, 2010, Rakoff-Nahoum et Medzhitov, 2009, So et Ouchi, 2010).

2. Objectifs du mémoire

De nos jours, le cancer est la première cause de mortalité dans le monde. C'est pourquoi ce domaine de recherche est en pleine expansion. Malgré les nombreuses connaissances accumulées ces dernières années sur son mécanisme, aucun traitement ne guérit complètement de la maladie. En effet, une résistance à ces divers traitements se met souvent en place. De plus, certains de ces traitements sont peu efficaces et parfois très toxiques. C'est pourquoi la recherche de nouvelles thérapies efficaces et peu toxiques est nécessaire pour améliorer la prise en charge des patients cancéreux.

Depuis de nombreuses années, il a été montré que l'alimentation jouait un rôle dans la prévention mais également pour limiter la progression du cancer. Les chercheurs se sont donc intéressés à l'utilisation de molécules naturelles issues de plantes, qui pourraient éradiquer le cancer. Dans ce sens, il a été observé que la pectine, un polysaccharide présent dans la paroi des cellules végétales, pouvait avoir des effets bénéfiques chez l'homme. Cependant, pour avoir des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses, la pectine doit être hydrolysée. Dans ce mémoire, la pectine de citrus est hydrolysée suite à un traitement à la chaleur.

Les mécanismes par lesquels ces fragments pectiques entraînent la mort cellulaire sont encore inconnus à l'heure actuelle. Ainsi, dans ce travail, nous avons essayé de déterminer le type de mort cellulaire induit par ces fragments dans deux lignées de cellules tumorales, les cellules A549 dérivant d'un adénocarcinome pulmonaire humain et les cellules HepG2, dérivant d'un hépatocarcinome humain. Pour cela, nous avons testé diverses molécules inhibitrices de l'apoptose, de l'autophagie ou de la nécroptose et mesuré la cytotoxicité et la viabilité cellulaires après 24 et 48 heures d'incubation en présence des fragments pectiques.

La deuxième partie de ce mémoire consiste à déterminer par quel récepteur sont reconnus les fragments pectiques. Ainsi, quatre récepteurs cibles ont été sélectionnés : la Galectine-3, le CD44, le CD168 et le TLR-4. La galectine-3 est connue pour reconnaître la MCP, tandis que les trois autres récepteurs ont été choisis car ils sont tous capables de reconnaître des polysaccharides comme l'acide hyaluronique. La pectine étant composée de polysaccharides et principalement d'acide galacturonique, ces récepteurs semblent être de bons candidats potentiels.

En conclusion, cette étude permettrait d'identifier le type de mort cellulaire induit et de déterminer le récepteur impliqué dans la reconnaissance des fragments pectiques. A plus ou moins long terme, une nouvelle stratégie thérapeutique utilisant de la pectine fragmentée pourrait être développée dans le but de combattre le cancer.

Matériel et méthodes

Tableau 3.1. Matériel utilisé pour la fragmentation de la pectine de citrus

MATERIEL	ORIGINE	REFERENCE
Autoclave	Sanyo, Belgique	Labo Autoclave
Eau distillée Milli-Q		
Lyophilisateur	Amsco Finn-Aqua, Allemagne	Liovac GT2
Méthanol	Acros Organics, USA	176840025
Pectine de Citrus	Sigma, USA	P9136-100G

Tableau 3.2. Matériel utilisé pour la culture cellulaire

MATERIEL	ORIGINE	REFERENCE
Boîtes de culture T75 (75 cm ²)	Corning, USA	3275
Boîtes de culture T25 (25 cm ²)	Corning, USA	430639
Centrifugeuse	Eppendorf, USA	Centrifuge 5702
Milieu MEM+GlutaMAX™	Gibco, UK	42360
Milieu DMEM	Gibco, UK	31885
Pipettes stériles de 5 mL	Corning, USA	4487
Pipettes stériles de 10 mL	Corning, USA	4488
Pipettes stériles de 25 mL	Corning, USA	4489
Phosphate Buffered Saline (PBS) stérile	Lonza, Belgique	BE17-516F
Sérum de veau fœtal	Gibco, UK	41G9704K
Trypsine EDTA	Gibco, UK	R001-100
Tube de 10 mL	Sterilin, UK	799007
Tube de 50 mL	Corning, USA	430829

3. Matériel et méthodes

3.1. Fragmentation de la pectine de citrus

3.1.1. Matériel

Voir tableau 3.1

3.1.2. Méthode

Dans le but de fragmenter la pectine de citrus (CP), le protocole mis au point par Jackson et al. (2007) est suivi. Afin d'obtenir une solution 0,1 % de pectine fragmentée, 500 mg de CP sont dissous dans 500 mL d'eau distillée. Cette dernière est préalablement chauffée à 100°C afin de permettre une meilleure dissolution de la pectine. Ensuite, cette solution est aliquotée dans 5 bouteilles de 200 mL et passée à l'autoclave pendant 1 heure à 123°C afin d'hydrolyser la pectine. Cette solution de pectine fragmentée, nommée HFCP, est répartie dans 2 ballons de 1 litre et plongée dans un mélange de méthanol et de carboglace à -80°C permettant de geler la solution sur la paroi des ballons. La solution est lyophilisée toute une nuit afin d'en éliminer l'eau car un vide d'air est créé par le lyophilisateur permettant la sublimation de l'eau (passage de la glace en vapeur) de la solution de fragments pectiques et ainsi, l'obtention d'un résidu sec. Ce lyophilisat est récolté et stocké à 4°C.

3.2. Culture cellulaire

3.2.1. Matériel

Voir Tableau 3.2

3.2.2. Méthode

Deux lignées cellulaires sont utilisées dans ce travail, les cellules A549, dérivant d'un adénocarcinome pulmonaire humain, et les cellules HepG2, dérivant d'un carcinome hépatique humain. Les cellules sont repiquées 2 à 3 fois par semaine selon leur confluence et sont cultivées dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium Eagle + Glutamax) pour les cellules A549, et dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) pour les cellules HepG2, chacun contenant 10 % de sérum fœtal de veau. Avant de repiquer, les différents produits utilisés (PBS, trypsine EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) et milieux cellulaires) et conservés à 4°C, sont préchauffés dans une étuve sèche ou au bain-marie à 37°C.

Après avoir décanté le milieu complet (milieu + 10 % sérum), les cellules sont rincées 2 fois avec 10 mL de PBS afin d'éliminer les déchets métaboliques, les cellules mortes et toute trace de sérum inhibant l'action de la trypsine. Cette dernière est une enzyme protéolytique clivant les protéines d'adhérence permettant ainsi le détachement des cellules. C'est pourquoi le tapis cellulaire est mis en contact avec 2 mL de trypsine-EDTA pendant 5 minutes dans une étuve sèche à 37°C, température à laquelle l'activité de la trypsine est optimale. La trypsine est additionnée d'EDTA car cette molécule permet la chélation des ions calcium, nécessaires à l'interaction de plusieurs protéines d'adhérence avec les constituants de la matrice extracellulaire. Après les 5 minutes, les cellules sont récoltées avec 4 mL de milieu complet dans un tube de 10 mL, certains constituants du sérum permettent d'inactiver l'action

Tableau 3.3. Ensemencement cellulaire suivant l'expérience à réaliser

Expérience	Culture en	Nombre de cellules A549	Nombre de cellules HepG2
Extraction protéique pour WB	T25	1000000	1000000
Extraction protéique avec siRNAs pour WB	T25	400000	400000
Extraction ARN pour qRT-PCR	T25	1000000	1000000
Extraction ARN avec siRNAs pour qRT-PCR	T25	400000	400000
Immunofluorescence	Plaque 24 puits	40000	60000
Test LDH	Plaque 24 puits	30000	50000
Test MTT	Plaque 24 puits	30000	50000

Tableau 3.4. Matériel utilisé pour l'ensemencement et l'incubation des cellules

MATERIEL	ORIGINE	REFERENCE
Bafilomycine	Sigma, USA	B1793
Etoposide	Sigma, USA	E1383-25mg
Filtre 0,20 μ M	Sarstedt, Allemagne	83.1826.001
3-méthyladénine	Sigma, USA	M9281-100mg
Plaque 24 puits	Corning, USA	3524
Nécrostatine	Sigma, USA	N9037-100mg
Z-VAD	BD Pharmingen, USA	550377

de la trypsine. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 1000 rpm afin de sédimenter les cellules. Après élimination du surnageant contenant la trypsine, le culot est resuspendu dans du milieu complet (volume dépendant de la dilution cellulaire souhaitée). Cette suspension est alorsensemencée dans de nouvelles boîtes de 75 cm² (T75) avec 15 mL de milieu complet frais dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5 % de CO₂.

3.3. Ensemencement cellulaire

3.3.1. Principe

Selon la rapidité de division des cellules, du temps d'incubation et du type de boîtes utilisé, les cellules doivent être ensemencées à une densité cellulaire définie dépendant de la nature de l'expérience qui sera réalisée (**Tableau 3.3**).

3.3.2. Matériel

Voir Tableau 3.4

3.3.3. Méthode

Une suspension cellulaire est préparée comme décrit dans le point précédent. Dans le but de préparer un volume de suspension cellulaire de densité donnée, les cellules doivent être comptées. C'est pourquoi, 20 µL de suspension cellulaire sont dilués dans 180 µL de milieu complet. Ensuite, afin de compter les cellules, 20 µL de cette nouvelle suspension cellulaire diluée sont disposés dans une cellule de Neubauer.

La cellule de Neubauer est une lame de microscope où deux quadrillages (supérieur et inférieur) de 9 carrés chacun, sont gravés. Dans ces 9 carrés, 4 carrés contenant 4X4 carrés plus petits sont agencés. Le principe est de compter, grâce à un microscope, le nombre de cellules présentes dans ces 4 carrés, au niveau du quadrillage supérieur puis inférieur. La moyenne de ces deux valeurs obtenues est calculée et les formules ci-dessous sont appliquées.

$\text{Nombre de cellules/mL} = \frac{\text{Moyenne X facteur de dilution (10) X 10000}}{4}$
$\text{Volume à prélever (µL)} = \frac{\text{Nombre de cellules par puits X 1000}}{\text{Nombre de cellules/mL}}$

Cette dernière valeur est multipliée par le nombre de puits ou des boîtes de 25 cm² (T25) utilisés. Ce volume est complété de milieu complet. Ainsi, 1 mL de cette suspension est ensemencé dans les puits d'une plaque 24 puits et 4 mL dans les T25. Les plaques ou les boîtes sont enfin incubées pendant 24 heures à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂.

Il faut noter que pour les marquages en immunofluorescence, les cellules doivent être ensemencées sur des lamelles couvre-objets. Pour se faire, les lamelles sont préalablement stérilisées en les plongeant dans l'éthanol. Après séchage, celles-ci sont déposées dans les puits d'une plaque 24 puits. Enfin, les cellules sont ensemencées sur ces lamelles.

3.4. Incubation cellulaire

3.4.1. Matériel

Voir Tableau 3.4

3.4.2. Méthode

Au cours de notre travail, les deux types cellulaires sont incubés en présence de pectine de Citrus à 3 mg/mL (P), ou de pectine de Citrus fragmentée par la chaleur, HFCP à 3 mg/mL (H). Afin de réaliser respectivement un contrôle négatif et un contrôle positif, les cellules sont également incubées en présence de milieu seul (M) et de milieu supplémenté d'étoposide à 50 μ M (E). L'étoposide est un agent utilisé en chimiothérapie. Il inhibe la topoisomérase II, enzyme nucléaire modulant la topologie de l'ADN et provoque ainsi des cassures double-brin permanentes dans l'ADN déclenchant à la fois, l'apoptose et l'autophagie (Hande, 1998, Hainsworth et Greco, 1995).

Afin de préparer les milieux H et P à 3 mg/mL, la pectine de Citrus et la pectine fragmentée sont pesées et dissoutes dans le milieu de culture hors de la hotte de culture stérile. Il est donc nécessaire, par la suite, de stériliser ces deux solutions à l'aide d'un filtre de 0,2 μ m. La solution stock d'étoposide est stérile et est diluée dans le milieu sous hotte à la concentration de 50 μ M.

Pour les incubations, 24 heures après l'ensemencement dans du milieu complet, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS stérile afin d'éliminer les cellules mortes, les déchets métaboliques et toute trace de sérum contenu dans le milieu complet. Les cellules sont enfin incubées avec les différentes solutions (M, E, H ou P) à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂ pour les périodes de temps déterminées (24 et 48 heures).

Dans certaines expériences, diverses molécules sont ajoutées aux milieux d'incubations. Une première molécule est le Z-VAD, un inhibiteur de caspases se liant irréversiblement au site catalytique des caspases, inhibant ces enzymes et par conséquent, l'apoptose (Slee et al., 1996). Elle est utilisée à une concentration de 20 μ M. Une deuxième molécule est la bafilomycine, un inhibiteur d'autophagie qui inhibe spécifiquement la pompe à protons ATPase présente à la surface des vacuoles lysosomales, résultant en une inhibition de l'acidification de ces vacuoles (et donc augmentation du pH intralysosomal) ainsi que de l'activité des enzymes cataboliques lysosomales et par conséquent, l'autophagie. On observe également une inhibition dans la dégradation des protéines endocytées (Yoshimori et al., 1991). Elle est utilisée à une concentration de 100 nM. Une autre molécule inhibant l'autophagie est la 3-méthyladénine. Celle-ci interfère avec la formation des autophagosomes car elle inhibe l'activité de la PI3K de classe III. De plus, elle inhibe également la dégradation des protéines endocytées (Seglen et Gordon, 1982). Elle est utilisée à une concentration 1 mM. La dernière molécule utilisée est la nécrostatine qui inhibe la mort cellulaire par nécrose en inhibant l'activité kinase de RIP1 (receptor-interacting protein), essentielle dans l'induction de ce type de mort cellulaire. Elle est utilisée à une concentration de 30 μ M.

3.5. Evaluation de la cytotoxicité : Mesure du relargage de la LDH

3.5.1. Principe

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique qui catalyse la conversion du lactate en pyruvate via la réduction du NADH+H⁺ en NAD⁺. Lors d'une atteinte à l'intégrité cellulaire, cette enzyme se retrouve dans le milieu de culture, sa quantité

Figure 3.1. Mécanisme d'action permettant de détecter l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH). (http://catalog.takara-bio.co.jp/en/product/basic_info.asp?unitid=U100005579)

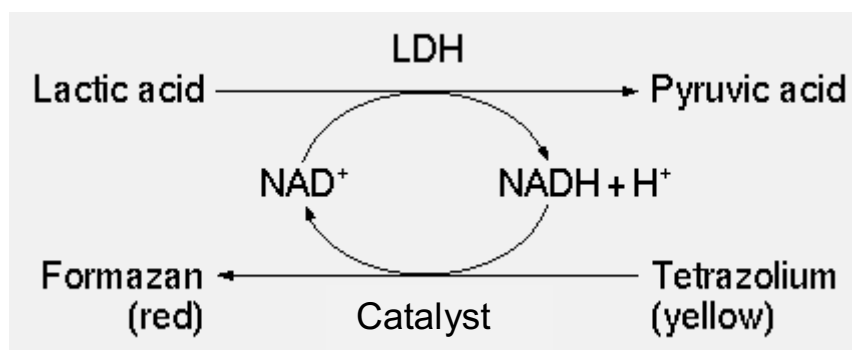


Tableau 3.5. Matériel utilisé pour la préparation de 1 L de PBS non stérile

MATERIEL	COMPOSITION	ORIGINE	REFERENCE
20 mL tampon phosphate 0,5M pH 7,4	KH ₂ PO ₄	Merck, Allemagne	1.05099.1000
	K ₂ HPO ₄	Merck, Allemagne	1.04873.1000
9 g NaCl		Merck, Allemagne	1.06404.1000
Eau distillée Milli-Q			

Tableau 3.6. Matériel utilisé pour la mesure du relargage de la LDH

MATERIEL	COMPOSITION	ORIGINE	REFERENCE
Centrifugeuse		Eppendorf, USA	Centrifuge 5415R
Cytotoxicity Detection Kit	222 µL Solution 1 (Catalyseur)	Roche, Allemagne	11 644 793 001
	10 mL Solution 2 (Sonde)		
Microtubes		Sarstedt, Allemagne	72.690.001
PBS non stérile		Voir Tableau 3.5	
Triton X100		Merck, Allemagne	1.12298.0101
Plaque 96 puits		Greiner, Allemagne	655101

étant proportionnelle au nombre de cellules mortes. Son activité enzymatique peut alors être mesurée grâce à un substrat de couleur jaune (sels de tétrazolium) qui, une fois catalysé par la LDH via l'oxydation du NAD^+ en $\text{NADH} + \text{H}^+$, relâche un groupement formazan soluble de couleur rouge (**Figure 3.1**). Sa concentration est quantifiée par une lecture d'absorbance à 490 et 655 nm au spectrophotomètre. Le pourcentage de cytotoxicité d'un échantillon est évalué par le rapport entre la quantité de LDH présente dans les différents compartiments de l'extraction c'est-à-dire le lysat cellulaire, le surnageant et le culot du surnageant.

3.5.2. Matériel

Voir Tableaux 3.5 et 3.6

3.5.3. Méthode

L'évaluation de la cytotoxicité par mesure du relargage de la LDH se réalise en deux parties distinctes :

- Séparation des différentes fractions (Lysat, Surnageant, Culot du surnageant)

Les cellules A549 et HepG2 sontensemencées dans des plaques 24 puits respectivement à une densité de 30.000 et 50.000 cellules par puits car les cellules A549 se répliquent plus rapidement que les cellules HepG2. 24 heures après l'ensemencement, les cellules sont incubées en triplicats en présence de M, E, H ou P (en présence ou en absence des différentes molécules citées ci-dessus). Un millilitre de ces différentes solutions est également incubé dans des puits vides afin de servir de blanc pour les surnageants lors du dosage final. Après 24 et 48 heures d'incubation, les surnageants sont récoltés dans des microtubes et conservés sur glace. 250 μL de PBS + 10 % de Triton sont déposés sur le tapis cellulaire afin de lyser les cellules restées adhérentes au fond du puits. La plaque est placée sur l'agitateur pendant au moins 10 minutes pour lyser les membranes cellulaires. Les microtubes contenant les surnageants sont centrifugés à 2000 rpm pendant 5 minutes à 4°C afin de culotter les cellules en suspension et les corps apoptotiques éventuellement présents dans le milieu de culture. Les surnageants sont alors récupérés dans une série de microtubes « surnageant » et placés sur la glace. Le culot est ensuite lysé avec 250 μL de PBS + 10 % de Triton (microtubes « culot »). Les lysats cellulaires issus des plaques 24 puits sont enfin récupérés dans une série de microtubes « lysat » et placés sur glace. Le dosage proprement dit se fait soit directement après, soit ultérieurement et les échantillons sont alors conservés à -70°C.

- Dosage de l'activité de la LDH

Ce dosage se réalise dans une plaque 96 puits. Pour chaque condition, 100 μL de la fraction « culot », 100 μL de la fraction « surnageant », 5 μL de la fraction « lysat » dilués dans 95 μL de PBS-Triton X100 10 %, ainsi que 2 x 100 μL du milieu d'incubation, sont déposés dans les puits. 2 x 100 μL de PBS-Triton X100 10 % sont également déposés, ils représentent le blanc pour les fractions « lysat » et « culot ». Ensuite, le réactif du kit est reconstitué : pour 100 puits, 222 μL de la bouteille 1 (Catalyseur) sont mélangés à 10 mL de la bouteille 2 (Sonde). Enfin, 100 μL de ce mix sont déposés dans chacun des puits. Après avoir éliminé les bulles des puits à l'aide d'une aiguille, la plaque est incubée à température ambiante à l'abri de la lumière. L'absorbance à 490 et 655 nm est lue toutes les 15 minutes. La valeur d'absorbance à 490 nm est soustraite de celle à 655 nm et à partir de ces valeurs, le pourcentage de cytotoxicité est déterminé grâce à la formule suivante :

Tableau 3.7. Matériel utilisé pour la mesure de la viabilité cellulaire (Test MTT)

MATERIEL	COMPOSITION	ORIGINE	REFERENCE
MTT 2,5 mg/ml	MTT	Sigma, USA	M-2128
	PBS non stérile	Voir Tableau 3.5	
Solution de lyse pH 4,7	2X SDS 30 %	ICN, USA	811030
	1X N,N-diméthyl-formamide	Sigma, USA	22705-6
Spectrophotomètre		Biorad	xMark

$$\% \text{ cytotoxicité} = 100 \times \frac{(c-b) + [(s-b) \times 4]}{(c-b) + (s-b) + [(l-b) \times 20]}$$

3.6. Mesure de viabilité cellulaire grâce au MTT

3.6.1. Principe

Le bromure de 3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphényl tétrazolium, plus communément appelé MTT, est une molécule qui, dans les cellules vivantes, est métabolisée par la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale. La réduction du groupement tétrazolium du MTT produit le formazan, un composé pourpre qui précipite dans les mitochondries. Sa quantité est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes présentes dans l'échantillon. Ainsi, plus il y a de cellules mortes (faible viabilité), plus la quantité de précipité sera faible. Elle est estimée après lyse cellulaire à l'aide d'un spectrophotomètre lors d'une mesure d'absorbance à 570 nm.

3.6.2. Matériel

Voir Tableau 3.7

3.6.3. Méthode

Les cellules A549 et HepG2 sontensemencées dans des plaques 24 puits respectivement à une densité de 30.000 et 50.000 cellules par puits. 24 heures après l'ensemencement, les cellules sont incubées en triplicats en présence de M, E, H ou P (en présence ou en absence des différentes molécules citées ci-dessus) pendant 24 et 48 heures. A la fin de l'incubation, 500 µL de MTT 2,5 mg/mL sont ajoutés aux différents milieux de culture pendant 2 heures à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂, conditions permettant un métabolisme cellulaire optimal. Après les 2 heures, les milieux de culture sont décantés et 1 mL de solution de lyse est déposé sur le tapis cellulaire. Les cellules sont incubées avec le tampon de lyse au minimum une heure sur un agitateur réglé à 70 rpm dans une pièce à 37°C. Enfin, les milieux des puits sont alors homogénéisés, et les bulles éventuelles sont éliminées à l'aide d'une aiguille. L'absorbance de la plaque est lue au spectrophotomètre à 570 nm.

3.7. Western Blot

3.7.1. Principe

Le western blot permet de séparer, après dénaturation, les protéines en fonction de leur poids moléculaire via une électrophorèse dans un gel. Les extraits protéiques obtenus sont chargés sur un gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) dénaturant les protéines. Via un courant électrique passant dans la cuve d'électrophorèse, les protéines migrent dans le gel. Elles migreront plus ou moins loin selon leur poids moléculaire. Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluorure (PVDF). L'abondance de la protéine d'intérêt est détectée grâce à un anticorps primaire spécifique de cette protéine dont le fragment Fc est reconnu par un anticorps secondaire, qui est lui-même couplé à un fluorochrome. La membrane est alors analysée par un scanner.

Tableau 3.8. Matériel utilisé pour l'extraction de protéines totales

MATERIEL	COMPOSITION	ORIGINE	REFERENCE
Centrifugeuse		Eppendorf, USA	Centrifuge 5415R
		Heraeus, Allemagne	Labofuge 400R
Phosphatase Inhibitor Buffer (PIB)	25 mM Na ₃ VO ₄	Sigma, USA	S-6508
	250 mM PNPP	Sigma, USA	N-3254
	250 mM β-glycérophosphate	VWR, Belgique	27874295
	125 mM NaF	Merck, Allemagne	6449
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	1 tablette dans 2 mL H ₂ O	Roche, Allemagne	11 836 145 001
Sonicateur (ultrasound technology)		Hielscher, Allemagne	
Racloir		SPL, Corée	ISO 9001
Tampon de lyse RIPA pH 7,5 (100 mL)	20 mM Tris HCl (0,242 g)	Merck, Allemagne	1.08382.0500
	150 mM NaCl (0,876 g)	Merck, Allemagne	1.06404.1000
	1 mM EDTA (0,037 g)	Merck, Allemagne	1.08418.0250
	1 mM EGTA (0,038 g)	Merck, Allemagne	8435
	1 % Déoxycholate de Na (DOC) (1 g)	Merck, Allemagne	1171352
	1 % MP40 nonidet (1 g)	Fluka Biochemica, USA	74385
	10 % glycérol (10 g)	Merck, Allemagne	1.04094.1000
HCl fumant		Merck, Allemagne	1.00314.1000

Tableau 3.9. Matériel utilisé pour le dosage de la concentration en protéines

MATERIEL	COMPOSITION	ORIGINE	REFERENCE
Bovine Serum Albumin (BSA)		Thermo, USA	PAAK41-017
Plaque 96 puits		Greiner, Allemagne	655101
Réactif	Pierce 660 nm Protein Assay Reagent	Thermo, USA	# 22660

Tableau 3.10. Matériel utilisé pour la préparation des échantillons pour le Western Blot

MATERIEL	COMPOSITION	ORIGINE	REFERENCE
Bleu de charge 5X	10 mL de Spacer Gel Buffer	Voir Tableau 3.11.	
	10 mL de SDS 20 %	ICN, USA	811030
	5 mL de β-mercaptoéthanol	Fluka Biochemica, USA	63690
	10 mL de glycérol 85%	Merck, Allemagne	1.04094.1000
	17,5 mg de bleu de bromophénol	Merck, Allemagne	8122
Etalon protéique	See Blue Plus 2 Prestained Standard 1X	Invitrogen, UK	LC5925

Tableau 3.11. Matériel utilisé pour la préparation des gels pour les analyses par Western Blot

MATERIEL	COMPOSITION	ORIGINE	REFERENCE
Gel Buffer (100 mL) pH 8,8	18,9 g de Tris	Merck, Allemagne	1.08382.0500
	0,4 g de SDS	ICN, USA	811030
	Eau distillée Milli-Q		
Gel concentrateur (5 mL)	1,25 mL de Spacer Gel Buffer		
	500 µL d'acrylamide/bisacrylamide	Bio-Rad, USA	# 1610158
	2,75 mL d'eau distillée Milli-Q		
	500 µL d'APS 1%	GE Healthcare, Suède	171311-01
	5 µL de Temed	GE Healthcare, Suède	171312-01
Gel séparateur 10% [8%] (10 mL)	2,5 mL de Gel Buffer		
	3,33 mL d'acrylamide/bisacrylamide [2,66]	Bio-Rad, USA	# 1610158
	3,67 mL d'eau distillée Milli-Q [4,34]		
	500 µL d'APS 1%	GE Healthcare, Suède	171311-01
	5 µL de Temed	GE Healthcare, Suède	171312-01
Spacer Gel Buffer (50 mL) pH 6,8	3,025 g de Tris	Merck, Allemagne	1.08382.0500
	0,2 g de SDS	ICN, USA	811030
	Eau distillée Milli-Q		

Tableau 3.12. Matériel utilisé pour la migration électrophorétique

MATERIEL	COMPOSITION	ORIGINE	REFERENCE
Tampon d'électrophorèse (1 L) pH 8,3-8,5	3,028 g de Tris	Merck, Allemagne	1.08382.0500
	14,4 g de glycine	Merck, Allemagne	1.04201.1000
	1 g de SDS	ICN, USA	811030
	Eau distillée Milli-Q		

Tableau 3.13. Matériel utilisé pour le transfert sur membrane

MATERIEL	COMPOSITION	ORIGINE	REFERENCE
Membrane PVDF		Millipore, USA	IPFL0010
Tampon de transfert (1 L)	4,8 g de Tris	Merck, Allemagne	1.08382.0500
	23 g de glycine	Merck, Allemagne	1.04201.1000
	200 mL de méthanol	Acros Organics, USA	176840025
	Eau distillée Milli-Q		

Tableau 3.14. Matériel utilisé pour le traitement de la membrane

MATERIEL	COMPOSITION	ORIGINE	REFERENCE
PBS non stérile		Voir Tableau 3.5	
PBS-Tween 0,1% (1 L)	1 L de PBS non stérile	Voir Tableau 3.5	
	1 mL de Tween 20	Merck, Allemagne	8.22184.0500
Solution bloquante Licor		Licor Odyssey, USA	927-40000

Tableau 3.15. Liste des anticorps primaires utilisés en Western Blot

Protéine ciblée	Poids moléculaire (kDa)	Espèce	Dilution	Origine	Référence
β-actine	42	Souris	30000	Sigma, USA	T5168
CD44	105-200	Souris	200	Cell Signaling, USA	#3570
CD168	83	Lapin	500	Abcam, UK	ab108339
Galectine-3	26-30	Lapin	20000	Abcam, UK	ab76466
TLR-4	90	Souris	500	Abcam, UK	ab22048

Tableau 3.16. Liste des anticorps secondaires utilisés en Western Blot (Révélation Licor)

ANTICORPS CIBLE	DILUTION	ORIGINE	REFERENCE
Anti-lapin 700	7500	Licor Biosciences, USA	#926-32221
Anti-lapin 800	7500	Licor Biosciences, USA	#926-32211
Anti-souris 700	7500	Licor Biosciences, USA	#926-32220
Anti-souris 800	7500	Licor Biosciences, USA	#926-32210

3.7.2. Matériel

Voir Tableaux 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15 et 3.16

3.7.3. Méthode

A) Extraction de protéines totales

Les cellules A549 et HepG2 sontensemencées dans des T25 à une densité de 1.000.000 de cellules par T25. 24 heures après l'ensemencement, les cellules sont incubées en présence de M, E, H ou P pendant 24 et 48 heures. A la fin des incubations, les milieux sont récoltés dans des tubes de 10 mL et centrifugés 5 minutes à 1000 rpm afin de culotter les cellules mortes ou non-adhérentes. Entre-temps, 200 μ L de tampon de lyse RIPA, supplémenté de 200 μ L de PIC et de 200 μ L de PIB, sont déposés sur le tapis cellulaire. Les cellules sont alors grattées à l'aide d'un racloir et récupérées dans des microtubes sur glace afin d'éviter la dégradation des protéines. Après la centrifugation des milieux, les surnageants des tubes de 10 mL sont éliminés et les culots sont resuspendus dans 30 μ L de lysat cellulaire. Ils sont ensuite ajoutés aux microtubes correspondants, contenant les lysats cellulaires. Les échantillons sont alors centrifugés à 13200 rpm pendant 10 minutes à 4°C de façon à séparer trois phases : la phase supérieure contenant l'ADN, la phase inférieure contenant les débris et les membranes cellulaires, et la phase intermédiaire contenant les protéines. 200 μ L de cette dernière phase sont récupérés dans une nouvelle série de microtubes. Ces microtubes sont enfin soniqués par le sonicateur afin de rompre les membranes cellulaires et libérer les protéines membranaires. Les microtubes sont alors stockés à -70°C.

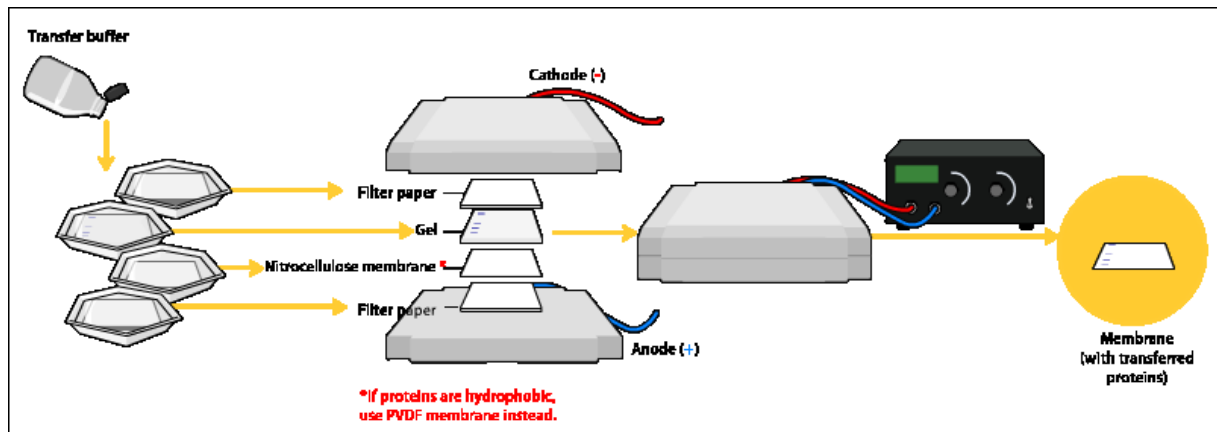
B) Dosage de la concentration en protéines avec le réactif de Pierce

Ce dosage se réalise dans une plaque 96 puits et permet de connaître la concentration en protéines contenue dans chaque extrait. Une droite d'étalonnage à la BSA est effectuée avec des concentrations croissantes de 0 à 10 mg/mL. Ainsi, des volumes de BSA allant de 0 à 10 μ L sont déposés dans les puits (en double), et de l'eau est ajoutée afin d'obtenir un volume total de 10 μ L. Ensuite, 9 μ L d'eau sont déposés dans les puits et 1 μ L de chacun des extraits protéiques à doser est ajouté en duplicats dans ces puits pour obtenir un volume total de 10 μ L. Des blancs sont également réalisés avec 9 μ L d'eau et 1 μ L de tampon de lyse RIPA. Enfin, 150 μ L de réactif Pierce sont ajoutés à chacun des puits. La plaque est déposée sur l'agitateur pendant 5 minutes. Après les 5 minutes, la réaction est stabilisée, les bulles éventuelles sont éliminées à l'aide d'une aiguille et l'absorbance est lue à 660 nm au spectrophotomètre. Les valeurs sont analysées par ordinateur via le programme Microplate Manager 6® qui les convertit en concentrations par rapport à la droite d'étalonnage.

C) Préparation des échantillons

Le volume des échantillons à charger sur le gel est calculé en fonction de la concentration en protéines obtenue par le dosage au Pierce afin d'obtenir 20 μ g de protéines. Pour avoir un volume de 20 μ L égal dans tous les échantillons, du tampon de migration est ajouté. Ensuite, du bleu de charge 5X pour un cinquième du volume total est ajouté à chaque échantillon. Ce dernier contient du SDS dénaturant les protéines et les chargeant négativement, du glycérol qui alourdit l'échantillon lui permettant de rester dans les puits une fois chargé et du bleu de bromophénol permettant de visualiser le front de migration. Les échantillons sont alors chauffés pendant 5 minutes à 100°C afin de dénaturer les protéines. Ils sont ensuite conservés à température ambiante jusqu'au moment d'être chargés sur le gel. Enfin, ils sont brièvement centrifugés à 13200 rpm afin de rassembler tout l'échantillon dans le fond du tube.

Figure 3.2. Schéma décrivant les différentes étapes du transfert des protéines du gel d'électrophorèse sur une membrane.



D) Migration

L'électrophorèse permet de faire migrer les protéines dénaturées en fonction de leur poids moléculaire. En présence de SDS, les protéines se chargent négativement. Après avoir chargé les échantillons sur un gel de polyacrylamide, grâce à un courant induit dans le gel, la migration des protéines se fait vers l'anode. Ainsi, les protéines migrant le plus vite sont les plus petites car elles se faufilent plus facilement entre les mailles du gel de polyacrylamide. Les gels de polyacrylamide sont constitués de deux couches, le gel concentrateur permettant de concentrer les échantillons et le gel séparateur permettant de séparer les protéines selon leur poids moléculaire.

Après avoir monté les plaques de verre autour des deux spacers et vérifié l'étanchéité du système avec de l'eau, le gel séparateur est préparé (10% pour révéler la Galectine-3 ou le CD168 et 8% pour révéler le CD44) et coulé jusqu'à environ 1,5 cm en dessous du fond des futurs puits. Une couche d'isobutanol est placée au-dessus du gel pour éviter tout contact avec l'oxygène présent dans l'air qui inhibe la polymérisation de l'acrylamide. Après une heure, la polymérisation est terminée, l'isobutanol est éliminé, le gel concentrateur est coulé et un peigne est inséré entre les plaques dans ce gel qui polymérise pendant une heure également. Le peigne est enlevé et le dispositif est ensuite installé dans la cuve d'électrophorèse, le tampon de transfert est préparé et versé dans la cuve. Les échantillons sont alors chargés dans les puits, tandis que 2 μ L d'étalon protéique See Blue Plus 2 sont chargés dans un puits supplémentaire. Le couvercle est posé sur la cuve et la migration est lancée à 200 V, 400 mA et 15 W. La puissance est multipliée par 2 s'il y a deux gels dans la cuve. La migration est stoppée lorsque le bleu de bromophénol atteint le bas du gel.

E) Transfert semi-sec

Lors d'une électrophorèse, les protéines migrent à l'intérieur du gel mais pour être accessibles dans le but d'être marquées par une sonde ou un anticorps, les protéines doivent être transférées sur une membrane. C'est pourquoi, un montage en sandwich est réalisé dans une cuve de transfert entre deux électrodes, permettant la migration des protéines du gel vers la membrane lorsqu'un courant y est appliqué (**Figure 3.2**).

A la fin de la migration, le gel est démoulé et équilibré pendant 10 minutes dans du tampon de transfert. La membrane de PVDF est réhydratée 1 minute dans du méthanol et équilibrée dans du tampon de transfert pendant au moins 15 minutes. Le montage en sandwich décrit ci-contre est réalisé, les bulles sont éliminées en roulant un tube sur le sandwich et le transfert est lancé pendant 2 heures à 5V et 150 mA.

F) Traitement de la membrane et révélation

Afin de visualiser l'abondance d'une protéine d'intérêt, la membrane est d'abord incubée avec un agent bloquant pour la saturer et éviter des liaisons aspécifiques. Ensuite, des anticorps spécifiques à la protéine d'intérêt sont déposés sur la membrane et se lient à cette protéine. Après lavages des anticorps non liés, un anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire couplé à une enzyme ou à une molécule fluorescente est incubé avec la membrane. Après lavage de l'excès d'anticorps, la protéine d'intérêt est détectable grâce à un film photographique ou un scanner.

La membrane est incubée avec du Blocking Buffer Licor dilué 4X dans du PBS non stérile pendant une heure à température ambiante. Ensuite, l'anticorps primaire dilué dans une solution de Licor-Tween 0,1% est incubé sur la membrane toute une nuit à 4°C (ou 1 heure à température ambiante). Le Tween empêche les liaisons aspécifiques de l'anticorps primaire. Par après, la membrane est rincée 4 fois dans du PBS-Tween 0,1% pendant 5 minutes puis incubée avec l'anticorps secondaire dilué dans du Licor-Tween 0,1% à température ambiante pendant 1 heure à l'abri de la lumière. Après cette incubation, la membrane est lavée 4 fois au

Tableau 3.17. Matériel utilisé pour un marquage en immunofluorescence

MATERIEL		ORIGINE	REFERENCE
Bovine Serum Albumin (BSA)		PAA, Autriche	K41-017
Lamelles couvre-objets (Ø=13 mm)		Karl Hecht, Allemagne	1001/13
Lames porte-objets		VWR, Belgique	631-0909
Méthanol 80% / Acétone 20% (100 mL)	80 mL Méthanol	Acros Organics, USA	176840025
	20 mL Acétone	Merck, Allemagne	1.00014.2500
Microscope confocal		Leica, Allemagne	TCS SP511
Mowiol		Sigma, USA	32.459-0
PBS non stérile		Voir Tableau 3.5	
Plaques 24 puits		Corning, USA	3254
RNase 2 mg/mL dans du PBS		IGN, USA	
To-Pro-3		Molecular Probes, USA	T3605

Tableau 3.18. Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence

Protéine ciblée	Espèce	Dilution	Origine	Référence
CD44	Souris	100	Cell Signaling, USA	#3570
Galectine-3	Lapin	100	Abcam, UK	ab76466
TLR-4	Souris	100	Abcam, UK	ab22048

Tableau 3.19. Liste des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence

Anticorps secondaire	Dilution	Origine	Référence
Anti-Ig de lapin couplé à l'Alexa 488 nm	1000	Molecular Probes, USA	A11008
Anti-Ig de souris couplé à l'Alexa 488 nm	1000	Molecular Probes, USA	A11001

PBS-Tween 0,1% pendant 5 minutes et 2 fois au PBS pour éliminer le Tween. Enfin, la membrane est placée entre deux papiers Whatman et mise à sécher à 37°C à l'obscurité pour 1 heure. Après 1 heure, la membrane est scannée dans un scanner Licor à 700 et 800 nm.

3.8. Marquage en immunofluorescence

3.8.1. Principe

Un marquage en immunofluorescence est réalisé afin de suivre la localisation d'une ou plusieurs protéines à l'intérieur des cellules. La protéine d'intérêt est marquée par un anticorps primaire spécifique qui est reconnu par un anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente. Cependant, l'anticorps va marquer une protéine qui se trouve au sein de la cellule et doit donc traverser certaines barrières biologiques telles que les membranes cellulaires. Ainsi, les membranes cellulaires sont préalablement perméabilisées avec un détergent. Toutefois, pour permettre cette étape, les cellules doivent être fixées afin de maintenir le contenu cellulaire intact.

3.8.2. Matériel

Voir Tableaux 3.17, 3.18 et 3.19

3.8.3. Méthode

Les cellules A549 et HepG2 sontensemencées sur des lamelles de verre dans des plaques 24 puits à une densité de 40.000 et 60.000 cellules par puits respectivement. 24 heures après l'ensemencement, les cellules sont rincées délicatement 3 fois avec 1 mL de PBS puis incubées pendant 10 minutes en présence de la solution méthanol 80%-acétone 20% conservée à -20°C pour fixer et perméabiliser les cellules. La fixation et la perméabilisation continuent à RT, la solution se réchauffe alors progressivement. Ensuite, les cellules sont rincées 3 fois pendant 5 minutes au PBS-BSA 1% qui va bloquer les cellules afin d'éviter tout signal non spécifique. Une bande de parafilm est déposée dans une chambre humide et des gouttes de 30 µL d'anticorps primaire dilué avec du PBS-BSA 1% sont déposées sur le parafilm. Il faut noter que l'anticorps ciblant CD168 n'est pas compatible avec l'immunofluorescence. Les lamelles sont ensuite retournées sur le parafilm, côté cellules contre la goutte, et incubées 2 heures à température ambiante. Les lamelles sont redéposées dans la plaque 24 puits afin d'être rincées 3 fois 5 minutes avec du PBS-BSA 2% et incubées 1 heure à température ambiante dans l'obscurité avec 30 µL d'anticorps secondaire dilué de la même manière que l'anticorps primaire. Ensuite, les lames sont de nouveau rincées 3 fois pendant 5 minutes dans du PBS-BSA 2% et montées sur des lames porte-objets en les retournant sur une goutte de Mowiol préalablement chauffé à 56°C. Après une nuit à 4°C, le Mowiol a polymérisé et les lames sont observées au microscope confocal à la longueur d'onde définie par l'anticorps secondaire.

Une étape supplémentaire après l'incubation de l'anticorps secondaire consiste à marquer les noyaux au To-pro-3-iodide, une sonde qui marque les acides nucléiques et réémet dans le rouge lointain. Ainsi, les cellules sont incubées 35 minutes à température ambiante avec le To-pro-3-iodide dilué dans une solution de ribonucléase 2 mg/mL dans du PBS puis rincées trois fois avec du PBS avant de monter les lamelles sur les lames porte-objets.

Tableau 3.20. Matériel utilisé pour la transfection de siRNAs

MATERIEL	ORIGINE	REFERENCE
DharmaFect N°1 Transfection Reagent	Dharmacon, USA	T-2001-03
Opti-MEM	Gibco, UK	31985
RiscFree siRNA #1, 20 nM	Dharmacon, USA	D-001220-01-20
Smart pool de siRNA anti- CD44, 20 µM	Dharmacon, USA	L-009999-00
Smart pool de siRNA anti- CD168, 20 µM	Dharmacon, USA	L-010409-00
Smart pool de siRNA anti- Gal3, 20 µM	Dharmacon, USA	L-010606-00

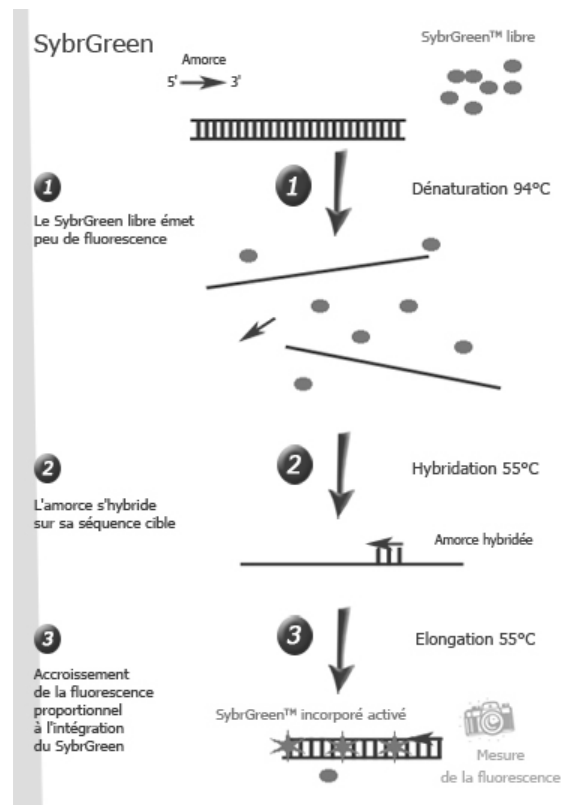
Tableau 3.21. Protocole à suivre pour réaliser le mix de transfection de siRNAs

Tube 1		Tube 2	
SiRNA	Opti-MEM	DharmaFect	Opti-MEM
Les siRNAs de concentration stock de 20 μ M sont dilués dans le milieu Opti-MEM pour obtenir la concentration finale en siRNAs voulue (50 nM) = 1/10 du volume final de transfection		Le DharmaFect est dilué 500X par rapport au volume final de transfection, dans du milieu Opti-MEM = 1/10 du volume final de transfection.	
Mélanger délicatement à la pipette et attendre 5 minutes		Mélanger délicatement à la pipette et attendre 5 minutes	
Après les 5 minutes, le contenu du tube 1 est transvasé dans le tube 2 et le mélange est délicatement mélangé à la pipette. Attendre 20 minutes que les complexes se forment. Après 20 minutes, mettre à volume avec du milieu DMEM + 10% de sérum pour les HepG2 ou MEM + 10% de sérum pour les A549.			

Tableau 3.22. Volumes pour réaliser le mix de transfection pour les T25 et les plaques 24 puits (concentration finale en siRNAs de 50 nM)

Récepteur	Tube 1		Tube 2		Milieu complet	Volume final de transfection
	siRNA (20 µM)	Opti-MEM	DharmaFect	Opti-MEM	(D)MEM + 10% Sérum	
T25	10 µL	390 µL	8 µL	392 µL	3,2 mL	4 mL
Plaque 24 puits	1,25 µL	48,75 µL	1 µL	49 µL	0,4 mL	0,5 mL

Figure 3.3. Représentation schématique du mécanisme d'action du SYBRGreen (<http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>)



3.9. Transfection de siRNAs

3.9.1. Principe

La transfection de siRNAs (small interfering RNA), qui sont de petits ARN double brins de 20-25 nucléotides, consiste à faire entrer à l'intérieur des cellules des siRNAs afin d'invalider l'expression de l'ARNm cible. Pour cela, les siRNAs sont complexés à un agent transfectant. Des lipides cationiques (Dharmafect-1) vont neutraliser les charges négatives des siRNAs et permettre leur internalisation grâce à l'interaction des domaines hydrophobes des lipides cationiques avec la membrane plasmique.

3.9.2. Matériel

Voir Tableaux 3.20, 3.21 et 3.22

3.9.3. Méthode

Les cellules A549 et HepG2 sontensemencées dans des plaques 24 puits (T25) à une densité respective de 30000 et 50000 de cellules par puits (400000 cellules par T25). 24 heures après l'ensemencement, le mix de transfection est préparé selon le protocole décrit aux Tableaux 3.19 et 3.20. Ensuite, l'ancien milieu des puits (des T25) est décanté et les cellules sont incubées en présence de ce mix pendant 24 heures. Après l'incubation, le milieu de transfection est décanté et remplacé par du milieu complet. 24 heures après, l'extraction protéique ou de l'ARN total des T25 est réalisée tandis que pour les plaques 24 puits, les cellules sont incubées avec M, E, H ou P pendant 24 et 48 heures. Enfin, la mesure de viabilité cellulaire est réalisée. Il est à noter que les cellules sont également transfectées avec des siRNAs RISC-free servant de contrôle négatif. Ce siRNA n'est pas reconnu par le complexe RISC et ne possède donc aucun effet.

3.10. PCR en temps réel

3.10.1. Principe

Le but de la RT-PCR en temps réel (qRT-PCR) est de quantifier l'expression de l'ARNm d'un gène d'intérêt dans différentes conditions. C'est sur la détection et la quantification d'un agent intercalant fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits au cours de la réaction que repose cette technique. Après avoir extrait l'ARN total des différents échantillons, ils sont dosés et l'ARNm est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc). Enfin, la dernière étape est la qPCR proprement dite.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification exponentielle de séquences d'ADN spécifiques. Elle se réalise grâce à des amorces complémentaires, préalablement désignées via le programme Primer Express 1.5, encadrant la séquence à amplifier. Dans le cas de la qPCR, la quantité d'amplicons produits au cours de la réaction se mesure par l'intensité de fluorescence du SYBRGreen, une molécule s'intercalant de manière non spécifique dans l'ADN double brin (**Figure 3.3**). Cet agent intercalant émet un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'ADN double brin formé, qui augmente au cours de la réaction jusqu'à atteindre un plateau de saturation. Ce signal est détecté à partir d'un certain seuil, le cycle seuil (Cycle threshold, Ct) qui correspond au point où le signal de fluorescence est supérieur au bruit de fond. La valeur de Ct est obtenue au cours de la phase exponentielle

Tableau 3.23. Matériel utilisé pour l'extraction d'ARN total

MATERIEL	ORIGINE	REFERENCE
Colonnes	Qiagen, Suisse	1011708
Ethanol	Merck, Allemagne	
Microtubes RNase free (2 mL)	Qiagen, Suisse	1050299
Microtubes RNase free (1,5 mL)	Qiagen, Suisse	1017981
Qiacube	Qiagen, Suisse	10187
Qiagen RNeasy mini Kit	Qiagen, Suisse	74104
Racloir	SPL, Corée	ISO 9001
RNase free water	Promega, USA	P119C
Rotor Adaptator	Qiagen, Suisse	1044402
SDS	ICN, USA	811030
Tips à filtre	Biosciences, USA	
Tips gris	Qiagen, Suisse	1050177

Tableau 3.24. Matériel utilisé pour le dosage de la concentration en ARN

MATERIEL	ORIGINE
Eau distillée Milli-Q	
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Isogen, Pays-Bas

Tableau 3.25. Matériel utilisé pour la transcription inverse

MATERIEL	ORIGINE	REFERENCE
Blocs chauffants	Techne Dri Block DB 2D	
RNase free water	Promega, USA	P119C
Transcription inverse kit	Roche, Allemagne	04 896 866 001

Tableau 3.26. Mix de réaction à préparer lors de la transcription inverse

Mix de réaction	Pour 7 µL - 4 µL de Buffer RT 5X - 0,5 µL Transcrit RT - 0,5 µL RNAsin - 2 µL dNTP mix
-----------------	--

Tableau 3.27. Matériel utilisé pour la PCR en temps réel

MATERIEL	ORIGINE	REFERENCE	
Amorces sens et antisens	Applied Biosystems, Pays-Bas	23 kDa	R : 161986913 F : 161989487
	IDT, USA	CD44	R : 161933750 F : 161933749
	IDT, USA	CD168	R : 161933746 F : 161934054
	IDT, USA	Gal-3	R : 161933745 F : 161933744
	IDT, USA	TLR-4	R : 161933748 F : 161933747
Appareil 7000 sequence detection system	Applied Biosystem, Pays-Bas	201753	
Centrifugeuse (Centra CL3R)	Thermo, USA		
Film plastique (Optical Adhesive Covers)	Applied Biosystem, Pays-Bas	4311971	
Plaque 96 puits	Applied Biosystem, Pays-Bas	N801-0560	
SYBRGreen	Roche, Allemagne	04 913 914 001	

Tableau 3.28. Amorces utilisées pour la PCR en temps réel

Gène étudié	Primer reverse	Primer forward
23 kDa	GCCTACAAGAAAGTTTGCCTATCTG	TGAGCTGTTTCTTCTTCCGGTAGT
CD44	CATTTGAAAGTGGAACCATTC	TTAACCCGATGATTGTACTGCAA
CD168	CGGAGGCCATTATGCTATGT	TCCCTTCCTCCTTTTCCCTA
Galectine-3	TTTGATTCTTGCAAGTTTGCAATTG	TGCCACTGTTGATCACTAGCTTTT
TLR-4	TTGCCCTGAAGACCCCAT	ACTTCCATGATTCTTGACACTCCAT

Tableau 3.29. Mix PCR à préparer pour chaque gène avec les amorces correspondant au gène étudié

Par gène	Par puits
H ₂ O distillée (milli-Q)	2,5 µL
Amorce R	2,5 µL
Amorce F	2,5 µL
SYBRGreen	12,5 µL

d'amplification et est toujours inversement proportionnelle à la quantité d'ADNc et donc à l'abondance d'ARNm de départ présent dans l'échantillon. Les résultats obtenus sont enfin normalisés en utilisant la valeur de Ct d'un gène de référence dont l'expression n'est pas censée être influencée par les conditions étudiées, le housekeeping gene, qui dans notre cas, est la protéine ribosomale 23kDa. Les valeurs obtenues après normalisation serviront à comparer l'abondance de l'ARNm des gènes d'intérêt dans les différentes conditions.

3.10.2. Matériel

Voir Tableaux 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28 et 3.29

3.10.3. Méthode

A) Extraction d'ARN total

Les cellules A549 et HepG2 sontensemencées dans des T25 à une densité de 1000000 de cellules par T25 (400000 quand transfection avec les siRNAs). 24 heures après l'ensemencement, ce milieu est décanté et jeté. 600 µL de la solution de lyse du QIAGEN RNeasy mini Kit est déposée sur les cellules afin de les lyser. Ensuite, les cellules sont raclées et le lysat cellulaire est transféré dans des tubes de 2 mL. La machine Qiacube est préparée : les tubes de 2 mL contenant le lysat sont placés au centre, les colonnes ainsi que des microtubes de 1,5 mL sont correctement placés dans les rotor adaptators, les différentes solutions du kit (Buffer RPE, Buffer RW1, Buffer RLT et RNase-free water) sont placées au bon endroit dans la machine et leurs niveaux sont vérifiés et les tips gris y sont également placés. Le Qiacube est lancé selon le mode QIAGEN RNeasy mini Kit et large samples. A la fin de l'extraction, les microtubes de 1,5 mL sont récupérés et le reste est jeté. Il est important de noter que cette étape se fait en conditions RNase free, donc tout le matériel utilisé est préalablement passé au SDS 1%.

B) Dosage de la concentration en ARN

Le dosage de la concentration en ARN se réalise en mesurant l'absorbance à 230, 260 et 280 nm au Nanodrop Spectrophotometer ND-1000, préalablement étalonnée avec 1 µL d'eau distillée pour faire le blanc. Enfin, 1 µL de chaque échantillon est déposé pour connaître sa concentration.

C) Transcription inverse

La transcription inverse permet de générer, de manière non-spécifique, de l'ADN complémentaire à partir des ARNm présents dans un échantillon d'ARN total via l'utilisation d'amorces poly-T. 2 µg d'ARN de chaque échantillon sont transférés dans des microtubes. 1 µL d'oligo dT (250 ng/µL) du Kit Roche est ajouté dans chaque microtube et le volume est porté à 13 µL avec de l'eau RNase Free. Ces microtubes sont chauffés pendant 10 minutes à 65°C. Pendant ce temps, le mix de réaction (7 µL par échantillon) est préparé (Voir Tableau 3.26). Après les 10 minutes d'incubation, les microtubes sont directement remis sur glace. Avant d'y ajouter le mix, les échantillons sont centrifugés. Une fois ces 7 µL de mix ajoutés, les microtubes sont incubés pendant 30 minutes à 55°C. Ensuite, ils sont à nouveau centrifugés et incubés pendant 5 minutes à 85°C. Enfin, les tubes contenant l'ADNc sont placés sur glace et conservés à -20°C.

D) PCR en temps réel

L'ADNc de chaque condition obtenu par la rétrotranscription est dilué 100X dans l'eau distillée (2 µL ADNc + 198 µL eau distillée) et un mix PCR spécifique pour chaque

gène étudié contenant les amorces appropriées est préparé. Ces amorces sont préalablement diluées 3X (1/3 de primer forward ou 1/3 de primer reverse + 2/3 d'eau distillée). Le SYBRGreen y est également ajouté. Ensuite, 20 µL de ce(s) mix sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits ainsi que 5 µL d'ADNc dilué 100X. Pour les contrôles négatifs, deux blancs sont préparés pour chaque condition, à la place de 5 µL d'ADNc, 5 µL d'eau sont ajoutés. La plaque est alors recouverte d'un film plastique et centrifugée 1 minute 30 à 1000 rpm. Enfin, la plaque est placée dans l'appareil qui effectuera une quarantaine de cycles d'amplification et mesurera en continu la fluorescence associée à chacun des puits. Plusieurs étapes se succèdent : la plaque est d'abord soumise à 50°C pendant 2 minutes. Ensuite, les échantillons sont dénaturés pendant 10 minutes à 95°C afin de dissocier complètement les deux brins d'ADN. Enfin, 40 cycles, constitués chacun de 15 secondes de dénaturation à 95°C suivi d'une hybridation à une température définie par la nature des amorces qui varie entre 50 et 60°C, et d'une élongation des amorces pendant 1 minute à 65°C qui se réalise grâce à l'ADN polymérase thermorésistante, sont effectués.

E) Analyse des résultats

Les valeurs Ct sont déterminées en fixant le seuil de détection à la moitié de la zone exponentielle. Ce cycle seuil correspond au cycle auquel l'intensité de la fluorescence est significativement plus élevée que celle du bruit de fond. Ensuite, le ΔCt est calculé en normalisant les valeurs Ct obtenues pour chaque gène par les valeurs Ct obtenues pour le housekeeping gene, 23kDa. Le $\Delta\Delta Ct$ est obtenu en soustrayant le ΔCt de la condition contrôle au ΔCt obtenu pour chaque condition. Enfin, le fold d'induction, qui correspond à l'expression relative d'un gène dans une condition test par rapport à la condition contrôle, est calculé par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.11. Analyse statistique

Pour chaque graphique de viabilité et de cytotoxicité cellulaires, des triplicats ont été réalisés pour chaque condition expérimentale et les résultats sont exprimés en temps que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). Une ANOVA 2 a été effectuée et la valeur P <0,05 est considérée comme statistiquement significative, la valeur P <0,01 est considérée comme hautement significative et la valeur P <0,001 est considérée comme très hautement significative. Dans les graphiques où les variances ne sont pas homogènes lors de l'analyse via un test de Hartley, un test de t Student est effectué.

Résultats

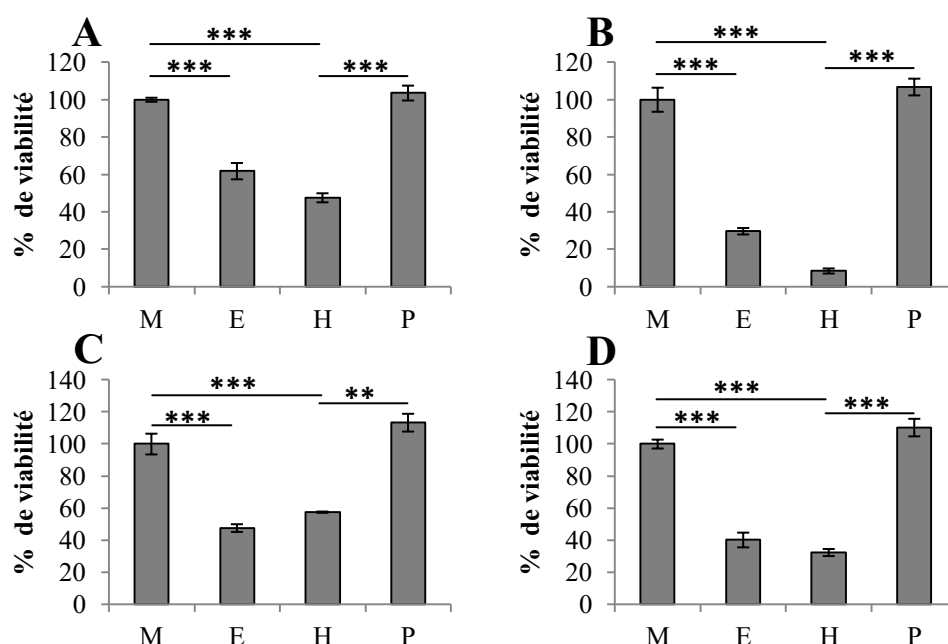


Figure 4.1 : Effet de l'PHFCP sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses HepG2 et A549. Les cellules HepG2 (A, B) et A549 (C, D) sont incubées pour 24h (A, C) ou 48 heures (B, D) en présence de milieu seul (M), d'étoposide à 50 μ M (E), de pectine fragmentée à 3 mg/mL (H), ou de pectine de citrus à 3 mg/mL (P). Après l'incubation, la viabilité cellulaire a été mesurée en réalisant un test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). (*= $P<0,05$, **= $P<0,01$, ***= $P<0,001$ selon une analyse ANOVA 2).

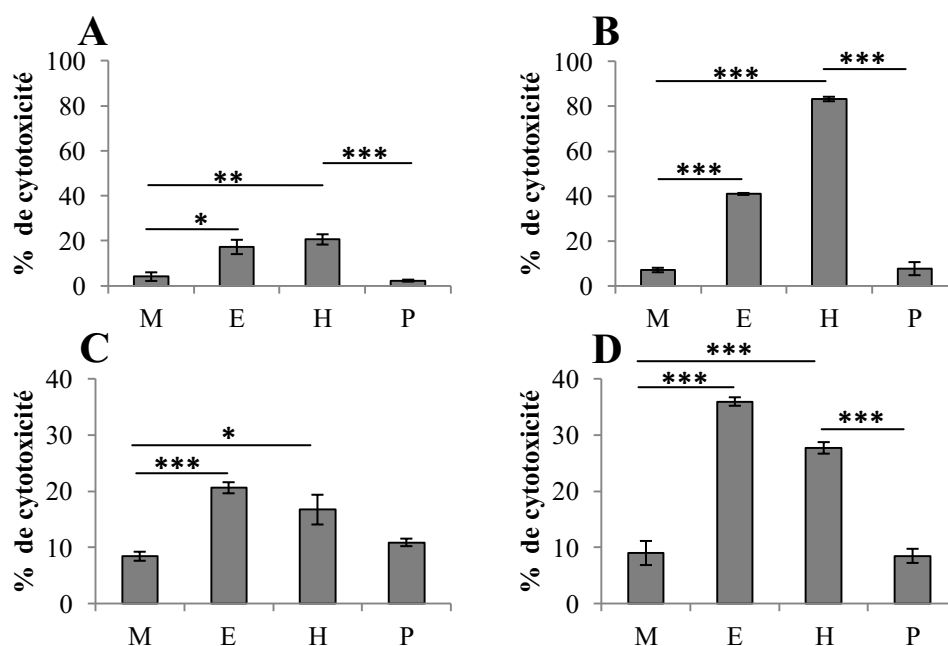


Figure 4.2 : Effet de l'PHFCP sur la cytotoxicité cellulaire des cellules cancéreuses HepG2 et A549. Les cellules HepG2 (A, B) et A549 (C, D) sont incubées pour 24h (A, C) ou 48 heures (B, D) en présence de milieu seul (M), d'étoposide à 50 μ M (E), de pectine fragmentée à 3 mg/mL (H), ou de pectine de citrus à 3 mg/mL (P). Après l'incubation, la cytotoxicité cellulaire a été mesurée en réalisant un test LDH. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). (*= $P<0,05$, **= $P<0,01$, ***= $P<0,001$ selon une analyse ANOVA 2).

4. Résultats

4.1. Etude de l'effet cytotoxique de la pectine fragmentée

Afin d'évaluer l'effet toxique de la pectine de citrus fragmentée à la chaleur (HFCP) sur les deux lignées cellulaires cancéreuses A549 et HepG2, une mesure de la viabilité cellulaire a été réalisée via un test MTT. Les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 et 48 heures avec du milieu seul (M), MEM ou DMEM respectivement, ou supplémenté de 50 μ M d'étoposide (E), de 3 mg/mL d'HFCP (H) ou de 3 mg/mL de pectine de citrus (P).

Nous observons que lorsque les cellules A549 et HepG2 sont incubées en présence de milieu seul, qui représente le contrôle négatif, la quantité de cellules vivantes augmente au cours du temps suite à la prolifération cellulaire et au faible taux de mort cellulaire (résultat non montré). Nous avons également observé que lorsque les cellules sont incubées en présence d'étoposide qui représente le contrôle positif, la quantité de cellules A549 et HepG2 vivantes diminuait de manière très hautement significative au cours du temps suite à l'induction de la mort cellulaire par cette molécule toxique et à l'absence de division cellulaire. Cette diminution de viabilité cellulaire est d'environ 40% après 24 heures et monte à 70% après 48 heures d'incubation dans les cellules HepG2. Dans le cas des cellules A549, cette diminution est de 50% après 24 heures et de 60% après 48 heures. Une telle mortalité s'observe aussi de manière très hautement significative quand les deux types cellulaires sont incubés en présence d'HFCP. En effet, une nette diminution de la quantité de cellules vivantes est remarquée. Cette diminution est de 60% après 24 heures et de 90% après 48 heures dans les HepG2 tandis que dans les A549, la diminution est de 40% après 24 heures et de 60% après 48 heures. En revanche, en présence de pectine non fragmentée, la viabilité cellulaire est similaire à celle observée pour le contrôle négatif, elle n'induit donc pas de mortalité cellulaire. Nous observons dans les deux types cellulaires une différence très hautement significative lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP par rapport à la pectine non fragmentée (**Figure 4.1**).

Pour confirmer ces résultats, nous avons ensuite effectué une mesure du relargage de l'enzyme LDH, qui se retrouve dans le milieu lors d'une atteinte de l'intégrité cellulaire : sa quantité y est alors proportionnelle au nombre de cellules mortes. Ainsi, les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 et 48 heures avec du milieu seul ou supplémenté d'étoposide, d'HFCP ou de pectine de citrus. Un taux basal de mort cellulaire (5-10%) est observé lorsque les deux types cellulaires se trouvent en présence de milieu seul et ce, après 24 et 48 heures. L'étoposide induit, quant à lui, une cytotoxicité qui se situe aux alentours de 20-25% dans les deux types cellulaires après 24 heures d'incubation. Cette augmentation de cytotoxicité est significative pour les cellules HepG2 et très hautement significative pour les A549. Après 48 heures d'incubation, ce niveau de cytotoxicité augmente encore, et de manière très hautement significative dans les deux types cellulaires, et se trouve aux environs de 35-40% dans les deux types cellulaires. Nous avons également observé, comme ce fut le cas dans le test de viabilité cellulaire, une cytotoxicité faible (similaire au milieu seul) quand les cellules A549 et HepG2 sont incubées en présence de pectine de citrus, contrairement à la HFCP dont la cytotoxicité est très élevée. En effet, après 24 heures d'incubation, le taux de toxicité de la HFCP se trouve aux alentours de 20% dans les deux types cellulaires. Cette augmentation est significative pour les cellules A549 et hautement significative pour les cellules HepG2 par rapport au milieu seul. Après 48 heures d'incubation, ce taux augmente à 35% pour les cellules A549 et à 70% pour les cellules HepG2. Ces augmentations sont très hautement significatives dans les deux types cellulaires. Cette cytotoxicité induite par HFCP

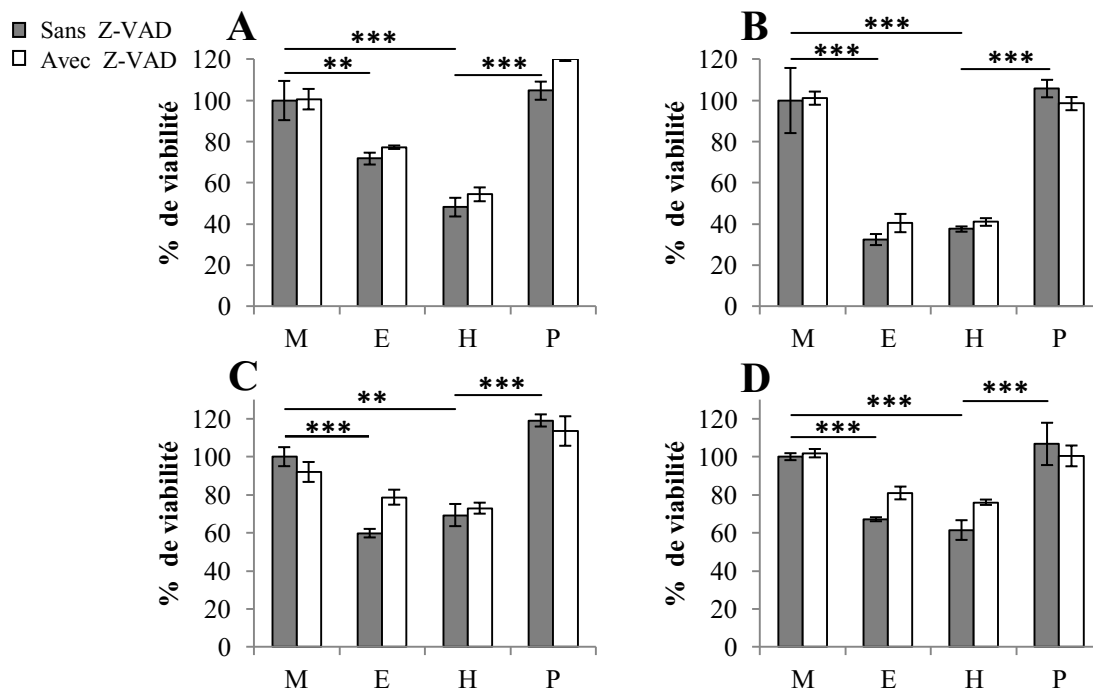


Figure 4.3 : Effet du Z-VAD sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses HepG2 et A549 en présence d'HFCEP. Les cellules HepG2 (A, B) et A549 (C, D) sont incubées pour 24h (A, C) ou 48 heures (B, D) en présence de milieu seul (M), d'étoposide à 50 μ M (E), de pectine fragmentée à 3 mg/mL (H), ou de pectine de citrous à 3 mg/mL (P) en présence ou en absence de Z-VAD à 20 μ M. Après l'incubation, la viabilité cellulaire a été mesurée en réalisant un test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). (*= P <0,05, **= P <0,01, ***= P <0,001 selon une analyse ANOVA 2).

dans les cellules HepG2 est beaucoup plus élevée que celle induite par l'étoposide (**Figure 4.2**).

Ainsi, ces expériences ont montré que la pectine fragmentée induisait une mort cellulaire statistiquement significative dans les cellules cancéreuses A549 et HepG2, contrairement à la pectine non fragmentée.

4.2. Détermination du type de mort cellulaire induit par la pectine fragmentée

Après avoir montré que la pectine fragmentée induisait de la mort cellulaire, la première partie du projet consiste à déterminer le type de mort cellulaire induit. Pour cela, différentes molécules inhibitrices de l'apoptose dépendante des caspases, de l'autophagie et de la nécroptose ont été utilisées afin d'inhiber ces différentes voies de mort et d'en suivre la conséquence sur les cellules incubées en présence d'HFCP.

4.2.1. Etude de l'apoptose

Afin d'investiguer l'implication de l'apoptose dépendante des caspases dans les mécanismes de mort cellulaire induite par HFCP dans les cellules cancéreuses A549 et HepG2, nous avons testé un inhibiteur de caspases, le Z-VAD. Cette molécule se lie irréversiblement au site catalytique des caspases, les rendant inactives, empêchant l'apoptose de se mettre en place.

Afin d'évaluer l'effet du Z-VAD sur les deux lignées cellulaires A549 et HepG2, une mesure de la viabilité cellulaire a été réalisée via un test MTT. Les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 et 48 heures avec du milieu seul ou supplémenté d'étoposide, d'HFCP ou de pectine de citrus en présence ou en absence de la molécule inhibitrice ajoutée à une concentration de 20 μ M. Ensuite, une mesure de la viabilité cellulaire a été réalisée afin d'évaluer le pourcentage de viabilité dans chacun des échantillons et de pouvoir analyser l'effet de l'inhibition des caspases.

Dans le cas des cellules HepG2, lorsqu'elles sont incubées pendant 24 et 48 heures en présence d'étoposide ou d'HFCP, la viabilité cellulaire diminue dû à l'effet toxique de ces molécules mais le Z-VAD semble ne pas avoir d'effet sur cette diminution de la viabilité cellulaire (**Figure 4.3A, B**). Il semblerait donc que la mort cellulaire induite par l'étoposide ou l'HFCP dans les HepG2 ne soit pas de l'apoptose dépendante des caspases.

Dans les cas des cellules A549, lorsqu'elles sont incubées pendant 24 et 48 heures en présence d'étoposide, on observe une tendance vers une augmentation de la viabilité cellulaire qui n'est cependant pas statistiquement significative par un test ANOVA 2. Lorsque les cellules A549 sont incubées pendant 24 heures en présence d'HFCP, le Z-VAD ne semble pas avoir d'effet sur la diminution de la viabilité cellulaire induite par cet agent toxique (**Figure 4.3C**). En revanche, après 48 heures, il y aurait une tendance d'augmentation de la viabilité cellulaire qui n'est cependant pas non plus statistiquement significative par un test ANOVA 2 (**Figure 4.3D**). Ainsi, il se pourrait que la mort cellulaire induite par l'étoposide et HFCP dans les cellules A549 se fasse via la voie de l'apoptose dépendante des caspases.

Afin de vérifier ces résultats dans les deux lignées cellulaires A549 et HepG2, nous avons réalisé une mesure de la cytotoxicité cellulaire par un test LDH. Les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 et 48 heures avec du milieu seul ou supplémenté d'étoposide, d'HFCP ou de pectine de citrus en présence ou en absence de Z-VAD à une

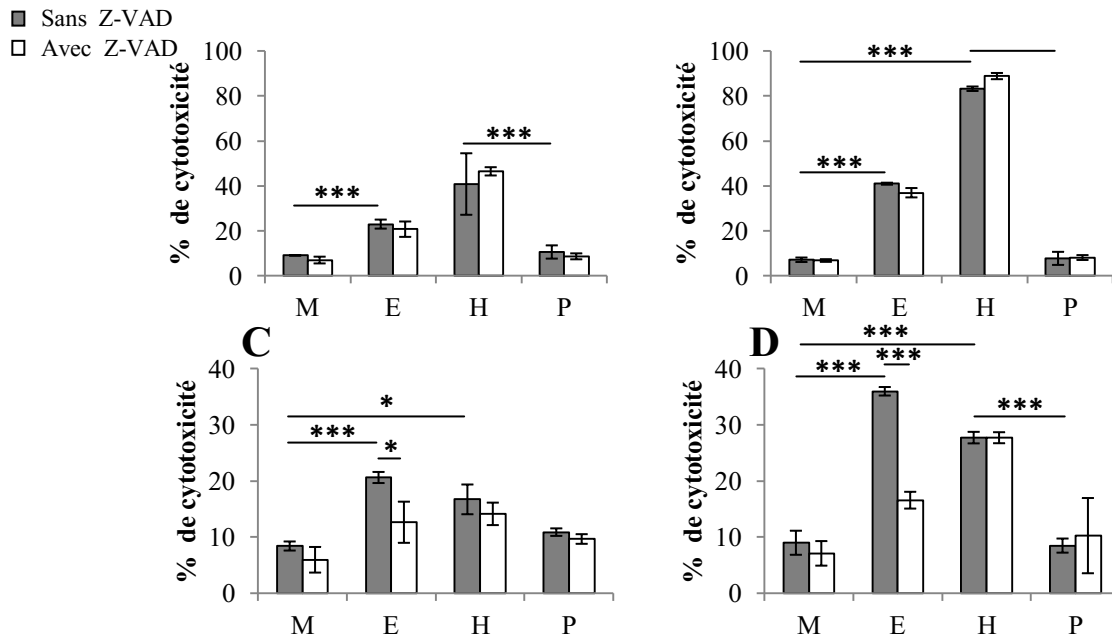


Figure 4.4 : Effet du Z-VAD sur la cytotoxicité cellulaire des cellules cancéreuses HepG2 et A549 en présence d'HFPC. Les cellules HepG2 (A, B) et A549 (C, D) sont incubées pour 24h (A, C) ou 48 heures (B, D) en présence de milieu seul (M), d'etoposide à 50 µM (E), de pectine fragmentée à 3 mg/mL (H), ou de pectine de citrus à 3 mg/mL (P) en présence ou en absence de Z-VAD à 20 µM. Après l'incubation, la cytotoxicité cellulaire a été mesurée en réalisant un test LDH. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). (*= P <0,05, **= P <0,01, ***= P <0,001 selon une analyse ANOVA 2 / t-student pour le graphique A).

concentration de 20 μ M. Ensuite, une mesure du relargage de la LDH a été réalisée afin d'évaluer le pourcentage de cytotoxicité dans chacun des échantillons et de pouvoir analyser l'effet de l'inhibition des caspases.

Dans le cas des cellules HepG2, lorsqu'elles sont incubées pendant 24 heures en présence d'étoposide ou d'HFCP, le Z-VAD semble ne pas avoir d'effet sur l'augmentation de la cytotoxicité induite par ces agents toxiques (**Figure 4.4A**). C'est également le cas lorsque les cellules sont incubées pendant 48 heures en présence d'étoposide ou d'HFCP, l'augmentation de cytotoxicité est toujours très hautement significative (**Figure 4.4B**). Il semblerait donc que l'apoptose dépendante des caspases ne soit pas impliquée dans la mort cellulaire induite par l'étoposide ni par l'HFCP. Ce résultat confirme donc celui obtenu par le test MTT.

Pour ce qui est des cellules A549, lorsqu'elles sont incubées pendant 24 et 48 heures en présence d'étoposide, le Z-VAD inhibe nettement la cytotoxicité induite par cet agent. En effet, après 24 heures d'incubation, nous observons une diminution de cytotoxicité cellulaire qui est statistiquement significative tandis qu'après 48 heures d'incubation, cette diminution est très hautement significative, suggérant que la mort cellulaire induite par l'étoposide serait au moins en partie due à de l'apoptose dépendante des caspases (**Figure 4.4C, D**). Ce résultat va dans le même sens que celui obtenu pour le MTT. Quand les cellules A549 sont incubées en présence d'HFCP, le Z-VAD ne semble pas diminuer la cytotoxicité cellulaire induite par cet agent toxique. Ces résultats, et ceux obtenus avec le test MTT suggèrent que l'apoptose dépendante des caspases ne serait pas responsable de la mort cellulaire induite par l'HFCP dans les cellules A549.

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats indique que l'apoptose dépendante des caspases n'intervient pas dans la mort cellulaire des cellules A549 et HepG2 lorsqu'elles sont incubées en présence des fragments pectiques mais qu'elle intervient quand les cellules A549 sont incubées en présence d'étoposide.

4.2.2. Etude de l'autophagie

Afin d'investiguer l'implication de l'autophagie dans les mécanismes de mort cellulaire induite par HFCP dans les cellules cancéreuses A549 et HepG2, nous avons testé deux inhibiteurs d'autophagie, la bafilomycine et la 3-méthyladénine. La première molécule inhibe la pompe à protons ATPase et la deuxième inhibe la PI3K empêchant la formation de l'autophagosome (voir figure 1.16).

a) La bafilomycine

Afin d'évaluer l'effet de la bafilomycine sur les deux lignées cellulaires A549 et HepG2, une mesure de la viabilité a été réalisée via un test MTT. Les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 et 48 heures avec du milieu seul ou supplémenté d'étoposide, d'HFCP ou de pectine de citrus en présence ou en absence de la molécule inhibitrice ajoutée à une concentration de 100 nM. Ensuite, une mesure de la viabilité cellulaire a été réalisée afin d'évaluer le pourcentage de viabilité dans chacun des échantillons et de pouvoir analyser l'effet de l'inhibition de l'autophagie.

Dans le cas des cellules HepG2, lorsqu'elles sont incubées pendant 24 et 48 heures en présence d'HFCP, la bafilomycine semble ne pas avoir d'effet sur la diminution de la viabilité cellulaire induite par cet agent toxique. En effet, nous n'observons pas d'augmentation de viabilité cellulaire lorsque l'inhibiteur d'autophagie est présent dans les milieux. Cependant, à 24 heures, en présence d'étoposide, il y a une tendance d'augmentation de la viabilité

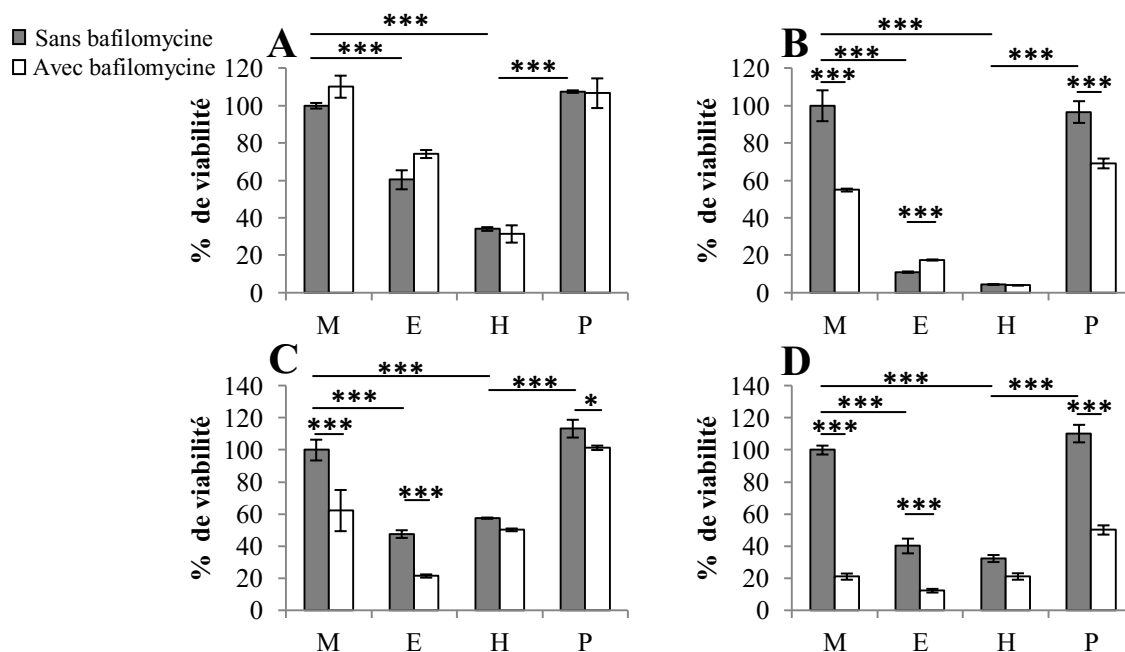


Figure 4.5 : Effet de la bafilomycine sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses HepG2 et A549 en présence d'HFPC. Les cellules HepG2 (A, B) et A549 (C, D) sont incubées pour 24h (A, C) ou 48 heures (B, D) en présence de milieu seul (M), d'étoposide à 50 μ M (E), de pectine fragmentée à 3 mg/mL (H), ou de pectine de citrus à 3 mg/mL (P) en présence ou en absence de bafilomycine à 100 nM. Après l'incubation, la viabilité cellulaire a été mesurée en réalisant un test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). (*= P <0,05, **= P <0,01, ***= P <0,001 selon une analyse ANOVA 2).

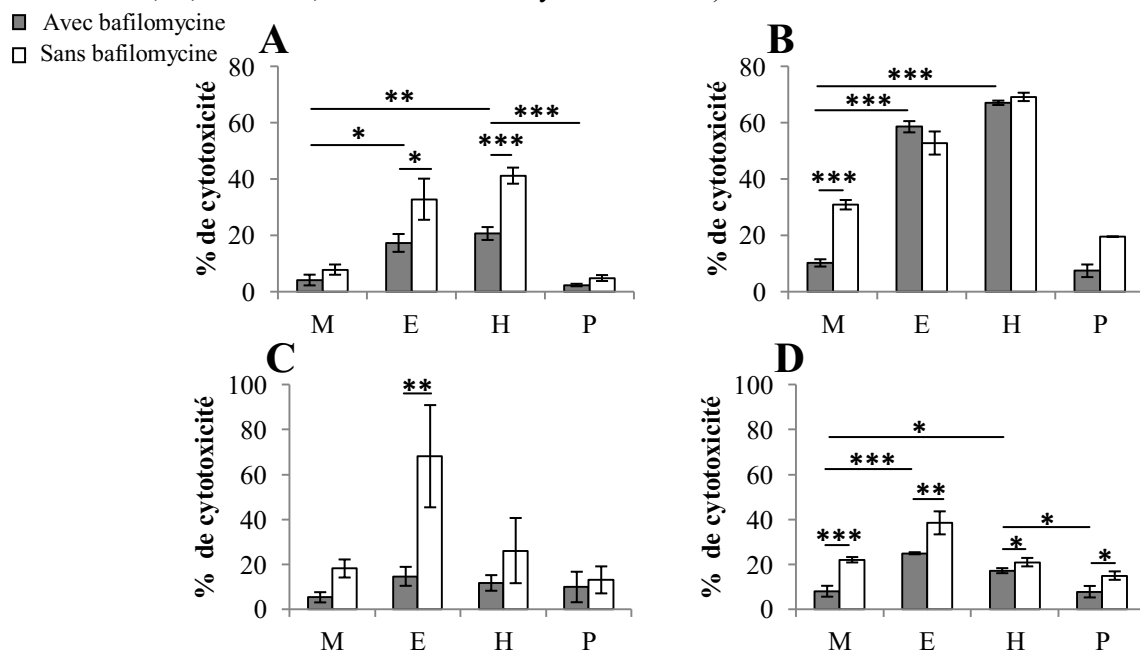


Figure 4.6 : Effet de la bafilomycine sur la cytotoxicité cellulaire des cellules cancéreuses HepG2 et A549 en présence d'HFPC. Les cellules HepG2 (A, B) et A549 (C, D) sont incubées pour 24h (A, C) ou 48 heures (B, D) en présence de milieu seul (M), d'étoposide à 50 μ M (E), de pectine fragmentée à 3 mg/mL (H), ou de pectine de citrus à 3 mg/mL (P) en présence ou en absence de bafilomycine à 100 nM. Après l'incubation, la cytotoxicité cellulaire a été mesurée en réalisant un test LDH. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). (*= P <0,05, **= P <0,01, ***= P <0,001 selon une analyse ANOVA 2 / t-student pour le graphique B).

cellulaire qui n'est cependant pas statistiquement significative par un test ANOVA 2 mais qui est très hautement significative après 48 heures d'incubation, la bafilomycine a donc un effet protecteur. Ainsi, dans les cellules HepG2, l'autophagie semblerait contribuer à la mort cellulaire induite par l'étoposide mais pas par l'HFCP. En revanche, il est à noter que cette molécule est toxique seule car dans le contrôle négatif (milieu seul) et lorsque les cellules sont incubées en présence de pectine non fragmentée pendant 48 heures, la viabilité cellulaire est très hautement significativement diminuée quand les cellules sont incubées en présence de la bafilomycine par rapport aux cellules incubées en absence de cette molécule (**Figure 4.5A, B**).

Dans le cas des cellules A549, nous observons également que la bafilomycine est toxique seule et ce, de manière plus importante car la toxicité de la molécule se remarque de manière très hautement significative déjà après 24 heures d'incubation en présence de milieu seul, d'étoposide et de pectine non fragmentée. Cette toxicité est encore plus importante après 48 heures (**Figure 4.5C, D**). On ne peut donc pas interpréter son effet sur la mort induite par l'étoposide ou l'HFCP.

Nous avons également évalué l'effet de la bafilomycine sur les deux lignées cellulaires HepG2 et A549 par un test LDH. Les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 et 48 heures avec du milieu seul ou supplémenté d'étoposide, d'HFCP ou de pectine de citrus en présence ou en absence de la molécule inhibitrice ajoutée à une concentration de 100 nM. Ensuite, une mesure du relargage de la LDH a été réalisée afin d'évaluer le pourcentage de cytotoxicité dans chacun des échantillons et de pouvoir analyser l'effet de l'inhibition de l'autophagie.

Dans le cas des cellules HepG2, après 24 heures d'incubation, nous constatons également une cytotoxicité de la bafilomycine seule et une cytotoxicité plus importante lorsque la bafilomycine est présente dans les milieux d'incubation de l'étoposide et de l'HFCP. Cette molécule est très toxique seule, c'est pourquoi il est difficile d'interpréter les résultats. Cette toxicité liée à la molécule s'observe également après 48 heures lorsque les cellules sont incubées en présence de milieu seul et de pectine non fragmentée (**Figure 4.6A, B**).

Dans le cas des cellules A549, la bafilomycine est également toxique seule car nous observons plus de cytotoxicité lorsque la molécule est présente dans les différents milieux que lorsqu'elle est absente (**Figure 4.6C, D**).

En conclusion, les résultats obtenus par les tests MTT et LDH pour la bafilomycine sont difficiles à interpréter car la molécule est toxique seule. Il semblerait quand même, en observant les résultats du test MTT, que l'autophagie contribuerait à la mort cellulaire induite par l'étoposide dans les cellules HepG2. Cependant, ce résultat ne se vérifie pas par la mesure de la libération de la LDH.

b) La 3-méthyladénine

Afin d'évaluer l'effet de la 3-méthyladénine sur les deux lignées cellulaires A549 et HepG2, une mesure de la viabilité a été réalisée via un test MTT. Les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 et 48 heures avec du milieu seul ou supplémenté d'étoposide, d'HFCP ou de pectine de citrus en présence ou en absence de la molécule inhibitrice ajoutée à une concentration de 1 mM. Nous avons choisi cette concentration, non toxique, suite à une mesure de la cytotoxicité intrinsèque de cette molécule à différentes concentrations (résultat non montré). Ensuite, une mesure de la viabilité cellulaire a été réalisée afin d'évaluer le

■ Sans 3-méthyladénine
□ Avec 3-méthyladénine

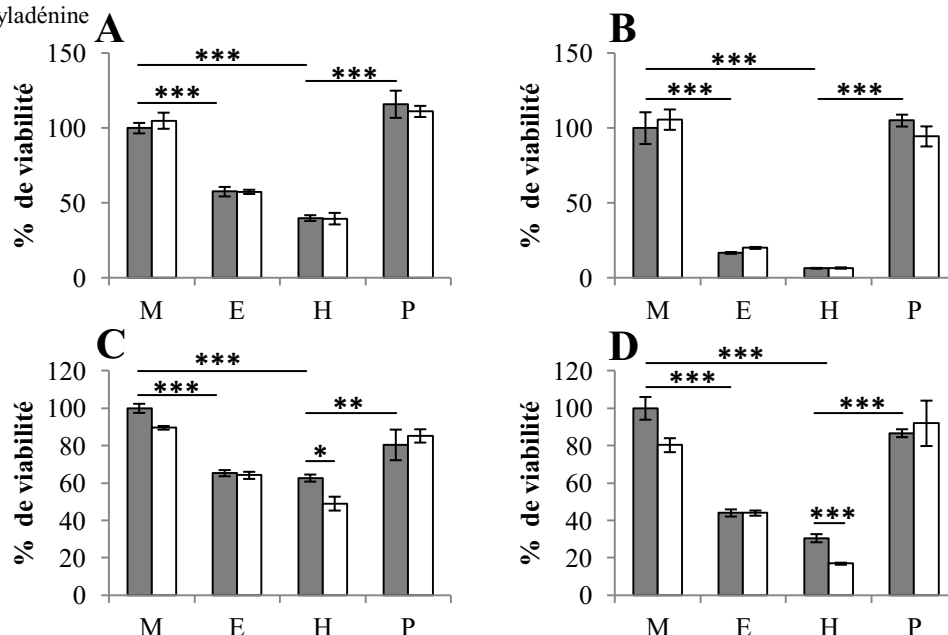


Figure 4.7 : Effet de la 3-méthyladénine sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses HepG2 et A549 en présence d'HFCP. Les cellules HepG2 (A, B) et A549 (C, D) sont incubées pour 24h (A, C) ou 48 heures (B, D) en présence de milieu seul (M), d'étoposide à 50 μ M (E), de pectine fragmentée à 3 mg/mL (H), ou de pectine de citrus à 3 mg/mL (P) en présence ou en absence de 3-méthyladénine à 1 mM. Après l'incubation, la viabilité cellulaire a été mesurée en réalisant un test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). (*= $P<0,05$, **= $P<0,01$, ***= $P<0,001$ selon une analyse ANOVA 2).

■ Sans 3-méthyladénine
□ Avec 3-méthyladénine

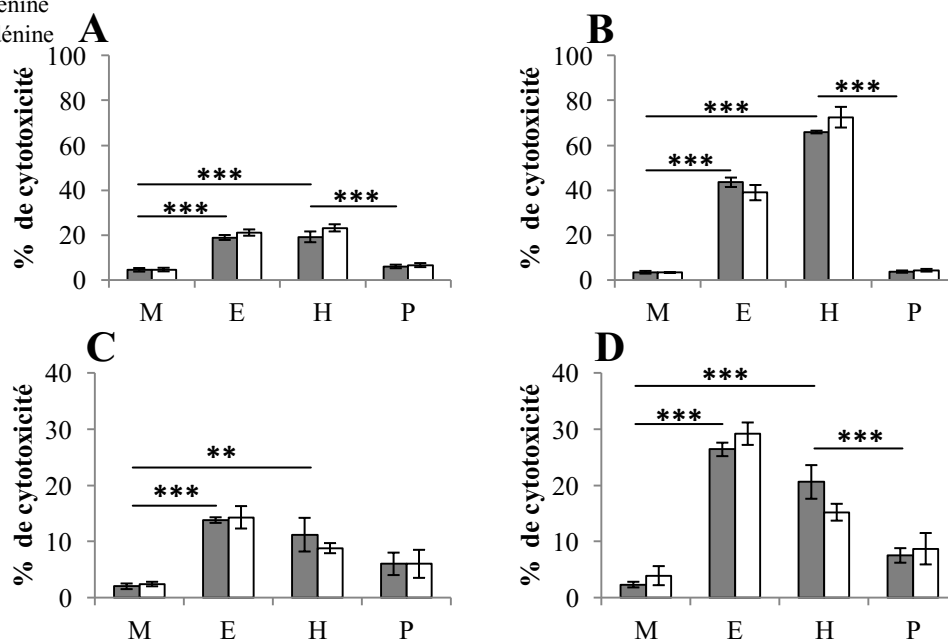


Figure 4.8 : Effet de la 3 méthyladénine sur la cytotoxicité cellulaire des cellules cancéreuses HepG2 et A549 en présence d'HFCP. Les cellules HepG2 (A, B) et A549 (C, D) sont incubées pour 24h (A, C) ou 48 heures (B, D) en présence de milieu seul (M), d'étoposide à 50 μ M (E), de pectine fragmentée à 3 mg/mL (H), ou de pectine de citrus à 3 mg/mL (P) en présence ou en absence de 3-méthyladénine à 1 mM. Après l'incubation, la cytotoxicité cellulaire a été mesurée en réalisant un test LDH. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). (*= $P<0,05$, **= $P<0,01$, ***= $P<0,001$ selon une analyse ANOVA 2).

pourcentage de viabilité dans chacun des échantillons et de pouvoir analyser l'effet de l'inhibition de l'autophagie.

Dans le cas des cellules HepG2, lorsqu'elles sont incubées pendant 24 et 48 heures en présence d'étoposide ou d'HFCP, la viabilité cellulaire diminue suite à l'effet toxique de ces molécules mais la 3-méthyladénine semble ne pas avoir d'effet sur cette diminution de la viabilité cellulaire (**Figure 4.7A, B**). Il semblerait donc que la mort cellulaire induite par l'étoposide ou l'HFCP dans les HepG2 ne soit pas de l'autophagie.

Dans le cas des cellules A549, lorsqu'elles sont incubées pendant 24 et 48 heures en présence d'étoposide, la 3-méthyladénine semble ne pas avoir d'effet sur cette diminution de la viabilité cellulaire. Il semblerait que l'autophagie n'intervienne pas dans la mort cellulaire induite par l'étoposide dans les cellules A549. Lorsque les cellules A549 sont incubées en présence de fragments pectiques, nous observons une tendance vers une diminution plus importante de la viabilité cellulaire lorsque le milieu est supplémenté avec la 3-méthyladénine et ce, après 24 et 48 heures d'incubation. Cette tendance n'est cependant pas significative avec un test ANOVA 2. Nous observons également une tendance de diminution non significative lorsque les cellules sont incubées en présence du milieu seul, le contrôle négatif (**Figure 4.7C, D**).

Afin de vérifier ces résultats dans les deux lignées cellulaires A549 et HepG2, nous avons réalisé une mesure de la cytotoxicité cellulaire par un test LDH. Les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 et 48 heures avec du milieu seul ou supplémenté d'étoposide, d'HFCP ou de pectine de citrus en présence ou en absence de 3-méthyladénine à une concentration de 1 mM. Ensuite, une mesure du relargage de la LDH a été réalisée afin d'évaluer le pourcentage de cytotoxicité dans chacun des échantillons et de pouvoir analyser l'effet de l'inhibition de l'autophagie.

Dans le cas des cellules HepG2, lorsqu'elles sont incubées pendant 24 et 48 heures en présence d'étoposide ou d'HFCP, la 3-méthyladénine semble ne pas avoir d'effet sur l'augmentation de la cytotoxicité induite par ces agents toxiques, suggérant que l'autophagie ne soit pas la voie induite (**Figure 4.8A, B**). Ce résultat confirme donc celui obtenu par le test MTT.

Pour ce qui est des cellules A549, lorsqu'elles sont incubées pendant 24 et 48 heures en présence d'étoposide, la 3-méthyladénine ne possède pas d'effet sur l'augmentation de cytotoxicité induite par l'étoposide. Ce résultat suggère que l'autophagie n'est pas impliquée dans la mort cellulaire induite par l'étoposide, confirmant le résultat obtenu pour le MTT (**Figure 4.8C, D**). Quand les cellules A549 sont incubées en présence d'HFCP, la 3-méthyladénine ne semble pas diminuer la cytotoxicité cellulaire induite par cet agent toxique. Ainsi, l'autophagie ne serait pas responsable de la mort cellulaire induite par l'HFCP dans les cellules A549.

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats indique que l'autophagie n'intervient pas dans la mort cellulaire des cellules A549 et HepG2 lorsqu'elles sont incubées en présence des fragments pectiques.

4.2.3. Etude de la nécroptose

Après avoir analysé l'apoptose dépendante des caspases et l'autophagie, un dernier type de mort cellulaire reste encore à être étudié, la nécroptose. Afin d'investiguer l'implication de la nécroptose dans les mécanismes de mort cellulaire induite par HFCP dans les cellules cancéreuses A549 et HepG2, nous avons testé un inhibiteur de nécroptose, la

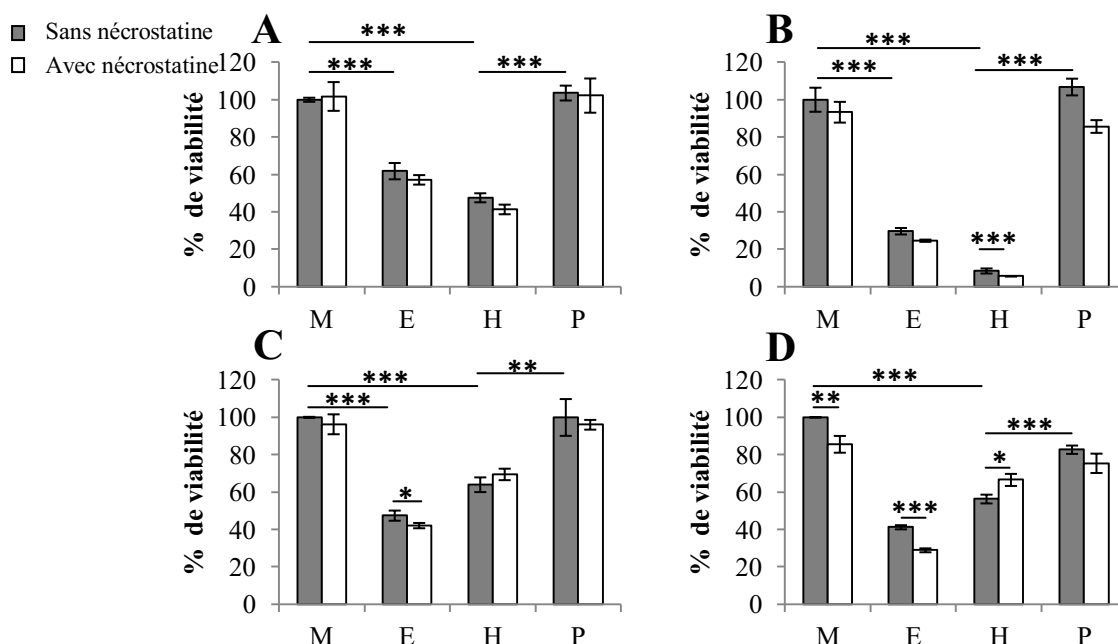


Figure 4.9 : Effet de la nécrostatine sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses HepG2 et A549 en présence d'HFCP. Les cellules HepG2 (A, B) et A549 (C, D) sont incubées pour 24h (A, C) ou 48 heures (B, D) en présence de milieu seul (M), d'étoposide à 50 μ M (E), de pectine fragmentée à 3 mg/mL (H), ou de pectine de citrus à 3 mg/mL (P) en présence ou en absence de nécrostatine à 30 μ M. Après l'incubation, la viabilité cellulaire a été mesurée en réalisant un test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). (*= P <0,05, **= P <0,01, ***= P <0,001 selon une analyse ANOVA 2 / t-student pour les graphiques C et D).

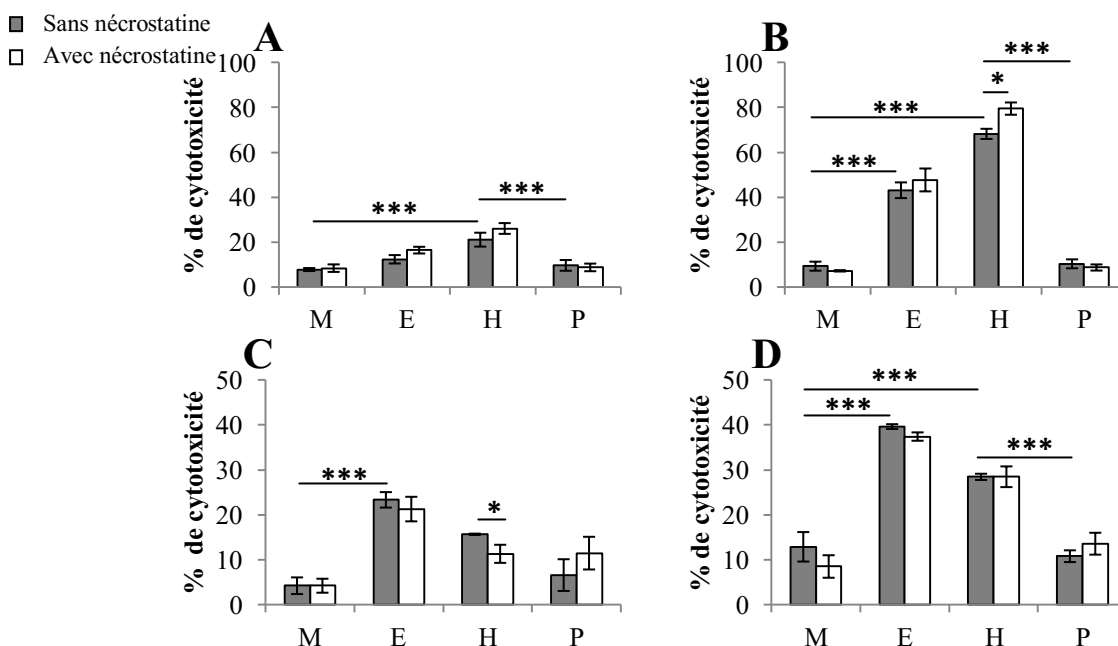


Figure 4.10 : Effet de la nécrostatine sur la cytotoxicité cellulaire des cellules cancéreuses HepG2 et A549 en présence d'HFCP. Les cellules HepG2 (A, B) et A549 (C, D) sont incubées pour 24h (A, C) ou 48 heures (B, D) en présence de milieu seul (M), d'étoposide à 50 μ M (E), de pectine fragmentée à 3 mg/mL (H), ou de pectine de citrus à 3 mg/mL (P) en présence ou en absence de nécrostatine à 30 μ M. Après l'incubation, la cytotoxicité cellulaire a été mesurée en réalisant un test LDH. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). (*= P <0,05, **= P <0,01, ***= P <0,001 selon une analyse ANOVA 2 / t-student pour le graphique C).

nécrostatine. Cette molécule se lie à la protéine kinase RIP1, l'inhibant, empêchant ainsi, la mise en place de la nécroptose.

Afin d'évaluer l'effet de la nécrostatine sur les deux lignées cellulaires A549 et HepG2, une mesure de la viabilité a été réalisée via un test MTT. Les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 et 48 heures avec du milieu seul ou supplémenté d'étoposide, d'HFCP ou de pectine de citrus en présence ou en absence de la molécule inhibitrice ajoutée à une concentration de 30 μ M. Nous avons choisi cette concentration suite à une mesure de la cytotoxicité intrinsèque de cette molécule à différentes concentrations (résultat non montré). Ensuite, une mesure de la viabilité cellulaire a été réalisée afin d'évaluer le pourcentage de viabilité dans chacun des échantillons et de pouvoir analyser l'effet de l'inhibition de la nécroptose.

Dans le cas des cellules HepG2, après 24 et 48 heures d'incubation, la nécrostatine semble ne pas avoir d'effet et ce, lorsque les cellules sont incubées en présence d'étoposide. C'est également le cas lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP pendant 24 heures. En revanche, après 48 heures d'incubation, l'inhibition de la nécroptose engendre une diminution de viabilité très hautement significative pour les cellules incubées en présence d'HFCP. La nécroptose ne semble donc pas impliquée dans la mort cellulaire induite par l'étoposide et les fragments pectiques dans les cellules HepG2 (**Figure 4.9A, B**).

Pour les cellules A549, lorsqu'elles sont incubées en présence d'étoposide pendant 24 heures, l'inhibition de la nécroptose par la nécrostatine semble plus toxique pour les cellules. En effet, nous observons une diminution significative de la viabilité cellulaire qui est très hautement significative après 48 heures d'incubation. Après 48 heures d'incubation en présence de milieu seul, nous observons également une diminution hautement significative, suggérant la toxicité de cette inhibition de nécroptose. Lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP, après 24 heures d'incubation, la molécule semble ne pas avoir d'effet sur la diminution de la viabilité cellulaire. Cependant, après 48 heures, nous remarquons une augmentation significative de la viabilité cellulaire lorsque la nécrostatine est présente dans le milieu HFCP, suggérant que la mort cellulaire induite par HFCP de manière tardive pourrait être de la nécroptose (**Figure 4.9C, D**). Il est à noter que les analyses statistiques réalisées sur les graphiques C et D de la figure 4.9 sont des tests t-student car les variances ne sont pas homogènes lorsqu'elles sont évaluées par le test de Hartley.

Afin de vérifier le résultat obtenu par le test MTT, un test LDH mesurant la cytotoxicité est réalisé dans les deux lignées cellulaires A549 et HepG2. Les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 et 48 heures avec du milieu seul ou supplémenté d'étoposide, d'HFCP ou de pectine de citrus en présence ou en absence de nécrostatine à une concentration de 30 μ M. Ensuite, une mesure du relargage de la LDH a été réalisée afin d'évaluer le pourcentage de cytotoxicité dans chacun des échantillons et de pouvoir analyser l'effet de l'inhibition de la nécroptose.

Dans le cas des cellules HepG2, après 24 heures d'incubation, il semblerait que la nécrostatine n'ait pas d'effet sur l'augmentation de la cytotoxicité cellulaire induite par l'étoposide et l'HFCP. En revanche, après 48 heures d'incubation, l'inhibition de la nécroptose semble très hautement significativement plus toxique pour les cellules qui sont incubées en présence d'HFCP, comme nous l'avons également montré dans le test MTT, suggérant que l'inhibition de la nécroptose est toxique à long terme lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP (**Figure 4.10A, B**). Néanmoins, il semblerait que la nécroptose ne soit pas responsable de la mort cellulaire induite par l'étoposide ou les fragments pectiques.

		HepG2		A549	
		HFCP	Etoposide	HFCP	Etoposide
Apoptose dépendante des caspases (Z-VAD)		-	-	-	+
Autophagie	Bafilomycine	-	$\pm ?$	-	-
	3-méthyladénine	-	-	-	-
Nécroptose (Nécrostatine)		-	-	$\pm ?$	-

Figure 4.11 : Tableau récapitulatif de l'effet des différentes molécules sur la viabilité et la cytotoxicité induite par l'HFCP et l'étoposide dans les cellules cancéreuses HepG2 et A549.

Dans le cas des cellules A549, lorsque les cellules sont incubées pendant 24 et 48 heures en présence d'étoposide, la nécrostatine ne semble pas avoir d'effet de protection. En effet, nous n'observons pas de diminution de cytotoxicité, suggérant que la mort cellulaire induite par l'étoposide n'est pas de la nécroptose. Nous ne remarquons pas non plus d'augmentation de cytotoxicité, comme c'était le cas dans le test MTT. De manière intéressante, nous observons après 24 heures, une diminution significative de la cytotoxicité cellulaire lorsque la nécrostatine est ajoutée au milieu HFCEP, suggérant que la mort cellulaire induite par HFCEP pouvait être de la nécroptose. Ce résultat ne s'observe pas après 48 heures, la nécrostatine n'ayant pas d'effet sur l'augmentation de cytotoxicité (**Figure 4.10C, D**).

Ainsi, il semblerait que la nécroptose ne soit pas impliquée dans la mort cellulaire induite par l'étoposide ou les fragments pectiques dans les cellules HepG2. Néanmoins, la toxicité est plus importante lorsque la nécrostatine est ajoutée au milieu HFCEP, suggérant que l'inhibition de la nécroptose est toxique pour ces cellules. Dans les cellules A549, il semblerait que la nécroptose soit peut-être impliquée dans la mort cellulaire induite par les fragments pectiques.

Pour conclure cette première partie du projet qui consiste à déterminer le type de mort cellulaire induit par les fragments pectiques, nous avons montré divers résultats mesurant soit la viabilité cellulaire, soit la cytotoxicité cellulaire après 24 et 48 heures d'incubation. Afin d'étudier le type de mort cellulaire dans deux lignées cellulaires cancéreuses, les cellules A549 et HepG2, nous avons testé différents inhibiteurs des trois voies de mort cellulaire, à savoir l'apoptose dépendante des caspases, l'autophagie et la nécroptose. Dans le cas des cellules HepG2, la mort cellulaire induite par HFCEP ne serait pas de l'apoptose dépendante des caspases. Pour ce qui est de l'autophagie, les résultats sont difficiles à interpréter car la première molécule utilisée, la bafilomycine, est toxique seule. En ce qui concerne la deuxième molécule inhibitrice, la 3-méthyladénine, l'autophagie ne semble pas jouer un rôle dans la mort cellulaire induite par HFCEP. Il semblerait également que la nécroptose ne soit pas la mort cellulaire induite par les fragments pectiques. Dans le cas des cellules A549, il semblerait que la mort cellulaire induite par HFCEP ne soit pas dépendante de la voie de l'apoptose dépendante des caspases. Pour l'autophagie, la première molécule utilisée, la bafilomycine, est toxique seule, comme pour les HepG2, rendant difficile l'interprétation des résultats. En testant la deuxième molécule inhibitrice, la 3-méthyladénine, l'autophagie ne semble pas jouer un rôle dans la mort cellulaire induite par HFCEP. En ce qui concerne la nécroptose, il semblerait qu'elle pourrait être impliquée dans la mort cellulaire. Nous avons également montré que la mort cellulaire induite par l'étoposide dans les cellules A549 serait de l'apoptose dépendante des caspases. Ces résultats sont repris dans un tableau récapitulatif (**Figure 4.11**).

4.3. Détermination du(es) récepteur(s) impliqué(s) dans la reconnaissance des fragments pectiques

La deuxième partie de ce mémoire consiste à déterminer le ou les récepteur(s) qui seraient impliqué(s) dans la reconnaissance des fragments pectiques. En effet, les mécanismes de reconnaissance de ces fragments sont encore inconnus à l'heure actuelle, c'est pourquoi nous avons choisi d'étudier le rôle de quatre récepteurs cibles qui sont la galectine-3, le CD44, le CD168 et le TLR-4. La galectine-3 est connue pour reconnaître les fragments pectiques générés par hydrolyse par pH (MCP), tandis que les trois autres récepteurs présentent des propriétés intéressantes telles que la reconnaissance des polysaccharides

Ct	Gal-3	CD44	CD168	TLR-4	23 kDa
HepG2	24,28	-	25,57	32,32	18,67
A549	26,00	26,65	27,34	31,58	19,56

Figure 4.12 : Expression de l'ARNm des quatre récepteurs candidats et du gène housekeeping, 23 kDa, dans les deux lignées cellulaires, A549 et HepG2. Les valeurs sont exprimées en Ct après la qRT-PCR.

comme l'acide hyaluronique. La pectine étant composée de polysaccharides et principalement d'acide galacturonique, ces récepteurs semblent être de bons candidats potentiels.

Premièrement, nous avons voulu mettre en évidence les expressions en ARNm et en protéine de ces récepteurs afin de voir s'ils étaient exprimés ou non dans les deux lignées cellulaires cancéreuses A549 et HepG2. Ensuite, nous avons inhibé l'expression de ces différents récepteurs par des siRNAs. Enfin, nous avons étudié l'effet de ces siRNAs sur la cytotoxicité cellulaire induite par les fragments pectiques.

4.3.1. Etude l'expression en ARNm et protéique des quatre récepteurs cibles dans les cellules cancéreuses A549 et HepG2

a) Expression en ARNm

Dans le but de vérifier que les quatre récepteurs cibles étaient exprimés ou non dans les deux lignées cellulaires cancéreuses A549 et HepG2, nous avons tout d'abord réalisé une qRT-PCR afin d'analyser l'expression en ARNm des récepteurs. Les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 heures avec du milieu contenant 10 % de sérum. Ensuite, l'ARN a été extrait et l'ARNm a été rétro-transcrit en ADNc. Cet ADNc a été utilisé pour la qPCR et les niveaux d'abondance des différents récepteurs ont été révélés en utilisant 23kDa comme gène housekeeping.

Dans le cas des cellules HepG2, nous remarquons que la galectine-3 et le CD168 sont exprimés contrairement au CD44 dont l'expression n'est pas détectée. En effet, les Ct de la galectine-3 et du CD168 sont, respectivement, de 24,28 et de 25,57 et sont assez proches de celui du gène housekeeping 23 kDa qui est de 18,67 tandis qu'aucun Ct n'est détecté pour le récepteur CD44. Nous observons également que le TLR-4 est très faiblement exprimé, il montre un Ct de 32,32.

Dans le cas des cellules A549, nous arrivons à détecter la galectine-3, le CD44 et le CD168. En effet, ils possèdent des Ct respectifs de 26,00, de 26,65 et de 27,34. Ces Ct sont proches du Ct du gène housekeeping 23 kDa qui est de 19,56. Nous remarquons également que le TLR-4 est très faiblement exprimé, comme c'est le cas pour les cellules HepG2. Son Ct est de 31,58 (**Figure 4.12**).

Ainsi, les cellules HepG2 expriment l'ARNm de la galectine-3 et du CD168 mais pas celui du CD44, tandis que les cellules A549 expriment l'ARNm de la galectine-3, du CD44 et du CD168. Le TLR-4 est très faiblement exprimé dans les deux types cellulaires.

b) Expression protéique

Après avoir vérifié l'expression en ARNm des quatre récepteurs candidats dans les deux lignées cellulaires A549 et HepG2 et montré que l'ARNm de la galectine-3 et du CD168 était exprimé dans les cellules HepG2 et que celui de la galectine-3, du CD44, et du CD168 l'était dans les cellules A549, l'expression protéique de ces récepteurs candidats a été étudiée.

Nous avons pour cela, premièrement, évalué cette expression par marquage en immunofluorescence. Les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 heures dans du milieu contenant 10 % de sérum. Les cellules ont ensuite été marquées par un anticorps ciblant spécifiquement chaque récepteur étudié. Cet anticorps primaire a été lui-même reconnu par un anticorps secondaires couplé à un fluorochrome réémettant dans le vert une fois excité. Les noyaux des cellules ont aussi été mis en évidence via le Topro-3-iodide.

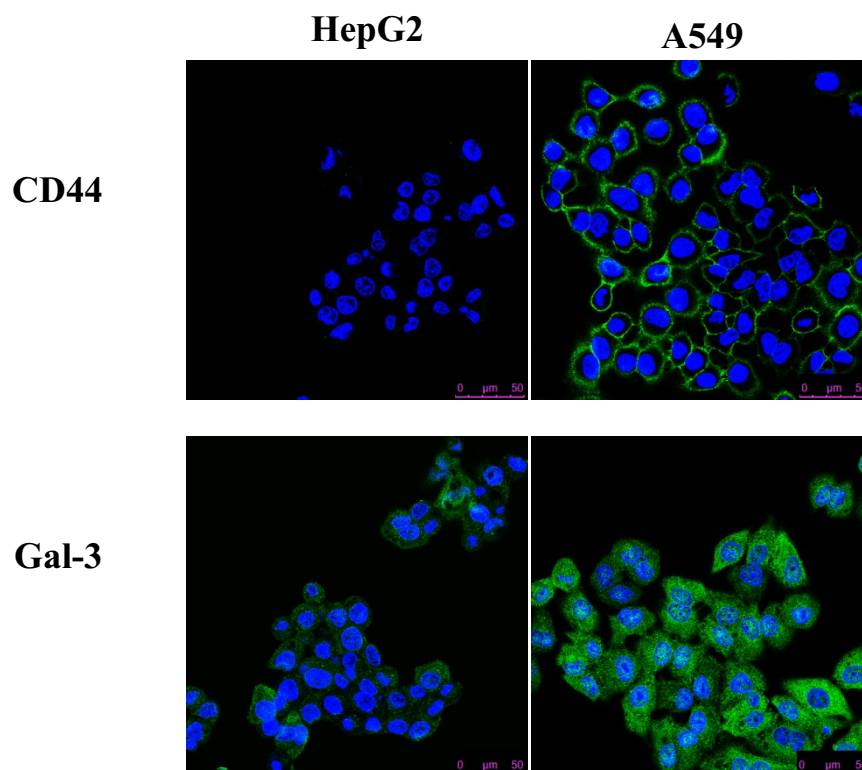


Figure 4.13 : Expression protéique de deux récepteurs candidats (CD44 et Gal-3) dans les deux lignées cellulaires, A549 et HepG2. La localisation des récepteurs a été observée au microscope confocal après avoir réalisé un marquage en immunofluorescence (vert). Les noyaux des cellules ont également été mis en évidence via un marquage au Topro-3-iodide (bleu).

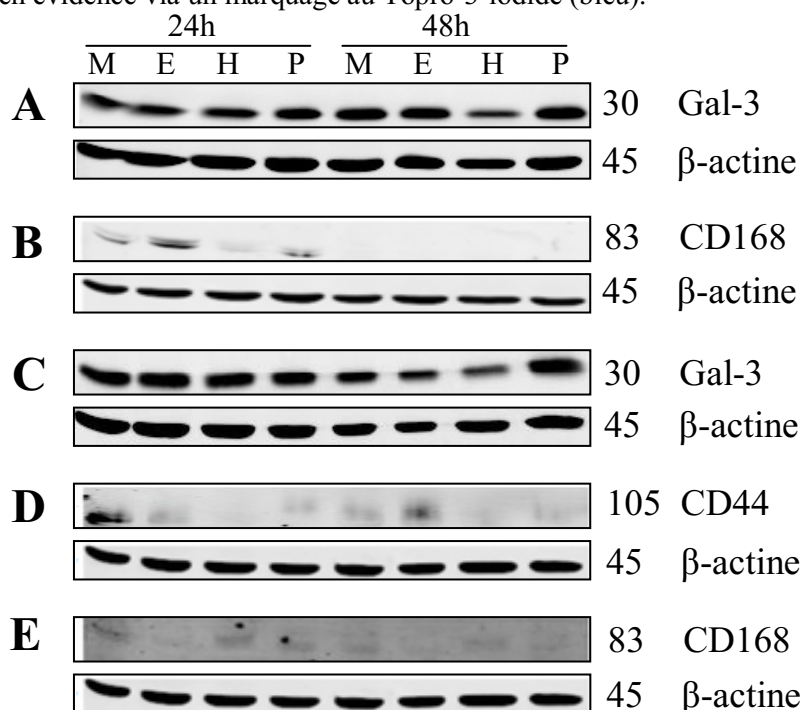


Figure 4.14 : Effet de la HFCP sur l'abondance protéique des trois récepteurs candidats dans les deux lignées cellulaires, A549 et HepG2. Les cellules HepG2 (A, B) ou les cellules A549 (C, D, E) ont été incubées pendant 24 et 48 heures en présence de milieu seul (M), ou de milieu supplémenté d'étoposide à une concentration de 50 μ M (E), d'HFCP à une concentration de 3 mg/mL (H) ou de pectine à une concentration de 3 mg/mL (P). Après l'incubation, des extraits protéiques totaux ont été récoltés et séparés par électrophorèse. L'abondance protéique de la galectine-3 (A, C), de CD44 (D), et de CD168 (B, E) a été mesurée par western blot. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge.

Dans le cas des cellules HepG2, nous ne détectons pas le récepteur CD44. En effet, aucune fluorescence verte n'est visible dans les cellules. Ce résultat confirme celui obtenu par qPCR où son expression en ARNm n'était pas détectée. Le récepteur TLR-4 n'est également pas détecté (résultat non montré), confirmant le résultat obtenu par qPCR où son expression en ARNm était très faible. La galectine-3 est quant à elle, détectée. Nous l'observons présente au niveau de la membrane cellulaire mais également dans le cytoplasme.

Dans le cas des cellules A549, nous localisons le récepteur CD44 en membrane plasmique. Pour ce qui est de la galectine-3, nous l'observons également dans les cellules A549 en membrane cellulaire mais aussi, comme pour les cellules HepG2, dans le cytoplasme. Et également comme pour les cellules HepG2, le récepteur TLR-4 n'est également pas détecté dans les cellules A549 (résultat non montré), confirmant le résultat obtenu par qPCR où son expression en ARNm était très faible. En ce qui concerne le récepteur CD168, il n'a pas été testé et ce, dans les deux types cellulaires, car l'anticorps n'est pas compatible avec un marquage en immunofluorescence (**Figure 4.13**).

Deuxièmement, nous avons également étudié l'expression protéique de ces différents récepteurs par western blot. En plus d'étudier l'expression protéique, l'effet d'HFCP sur les niveaux d'expression protéique des récepteurs candidats a été également investiguée. Les cellules A549 et HepG2 ont été incubées pendant 24 et 48 heures avec du milieu seul ou supplémenté d'étoposide, d'HFCP ou de pectine de citrus. Après les incubations, les extraits protéiques totaux sont récoltés et dosés. Enfin, 20 µg de protéines sont chargés sur un gel de polyacrylamide et transférés sur une membrane PVDF. Les différents récepteurs sont alors révélés par l'anticorps primaires qui est lui-même révélé par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. La β -actine a aussi été révélée comme contrôle de charge.

Dans le cas des cellules HepG2, nous détectons l'expression de la galectine-3 après 24 et 48 heures d'incubation. Après 24 heures d'incubation, il semble qu'il n'y ait pas de changement dans les niveaux protéiques lorsque les cellules HepG2 sont incubées en présence des différents produits. Cependant, après 48 heures d'incubation, il semblerait qu'il y ait une diminution d'expression de ce récepteur lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP. On pourrait expliquer cette observation par le fait que la galectine-3 reconnaît les fragments pectiques et que cette reconnaissance déclenche l'endocytose du complexe ligand-récepteur à l'intérieur de la cellule, diminuant ainsi son expression (**Figure 4.14A**). Pour le récepteur CD44, nous ne détectons pas son expression dans les cellules HepG2 (résultat non montré), confirmant les résultats obtenus précédemment par qPCR et immunofluorescence. En ce qui concerne le récepteur CD168, l'expression de CD168 n'est détectée qu'après 24 heures d'incubation dans les extraits issus des cellules HepG2. Nous ne le détectons plus après 48 heures d'incubation, peut-être à cause de l'absence de sérum dans les divers milieux d'incubation. De manière intéressante, son niveau protéique diminue lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP, suggérant également l'endocytose de ce récepteur lorsqu'il y aurait reconnaissance des fragments pectiques (**Figure 4.14B**). L'expression du dernier récepteur étudié, le TLR-4 n'est pas détectée (résultat non montré), confirmant les résultats obtenus précédemment par qPCR et par immunofluorescence.

Dans le cas des cellules A549, nous détectons l'expression de la galectine-3 après 24 et 48 heures d'incubation. Après 24 heures d'incubation, il semble qu'il n'y ait pas de changement dans les niveaux protéiques lorsque les cellules A549 sont incubées en présence des différents produits. Cependant, après 48 heures d'incubation, il semblerait qu'il y ait une diminution d'expression de ce récepteur lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP. Il se pourrait aussi, comme c'est le cas pour les cellules HepG2, que la galectine-3 reconnaisse les fragments pectiques et que cette reconnaissance déclenche l'endocytose du complexe ligand-récepteur à l'intérieur de la cellule, diminuant ainsi son expression (**Figure**

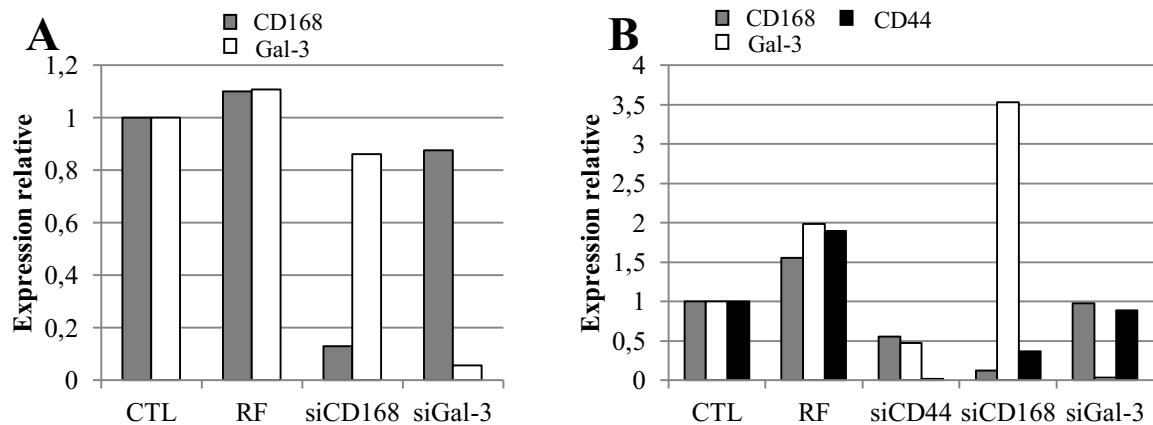


Figure 4.15 : Effet des siRNAs sur l'abondance en ARNm des trois récepteurs candidats dans les deux lignées cellulaires, A549 et HepG2. Les cellules HepG2 (A) ou les cellules A549 (B) ont été transfectées pendant 24 heures en présence de siRNAs ciblant un récepteur à une concentration de 50 nM. Après la transfection, les cellules sont incubées en présence de milieu complet pendant 24 heures. Après l'incubation, des extraits d'ARNm ont été récoltés et dosés. L'abondance d'ARNm de la galectine-3, de CD44 et de CD168 a été mesurée par qRT-PCR. 23 kDa a été utilisé comme gène housekeeping.

4.14C). Dans le cas du récepteur CD44, son expression est détectée dans les extraits issus des cellules A549, après 24 et 48 heures, sous forme de smear à cause de la reconnaissance de toutes les isoformes par l'anticorps. Aux deux temps d'incubation, l'abondance de CD44 est plus faible lorsque les cellules A549 sont incubées en présence d'HFCP, suggérant également l'endocytose du récepteur et du ligand dans la cellule (**Figure 4.14D**). En ce qui concerne le récepteur CD168, une bande très pâle est observée dans les extraits des cellules A549, suggérant l'expression de ce récepteur. Il semblerait qu'il n'y ait pas de changements dans les niveaux protéiques lorsque les cellules sont incubées avec les différents produits et ce, quel que soit le temps d'incubation (**Figure 4.14E**). L'expression protéique du TLR-4 n'est pas non plus détectée par western blot dans les extraits des cellules A549 (résultat non montré), confirmant le résultat obtenu par qPCR et par immunofluorescence.

Ainsi, au niveau protéique, les cellules HepG2 expriment la galectine-3 et le CD168. Au niveau des western blot, l'expression de la galectine-3 diminue lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP pendant 48 heures, suggérant son endocytose lorsqu'il y aurait reconnaissance des fragments pectiques. Pour ce qui est du CD168, son expression n'est détectée qu'après 24 heures et est diminuée lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP, suggérant également son endocytose. Pour les cellules A549, l'expression de la galectine-3, du CD44 et du CD168 y sont détectées. L'expression de la galectine-3 semble diminuer lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP pendant 48 heures, suggérant son endocytose. C'est également le cas pour le récepteur CD44 aux deux temps d'incubation. Pour le CD168, il semblerait qu'il n'y ait pas de diminution d'expression de ce récepteur quand les cellules sont incubées en présence d'HFCP. En ce qui concerne le dernier récepteur étudié, le TLR-4, nous ne détectons pas son expression protéique et ce, dans les deux types cellulaires. De plus, comme montré lors de la qPCR, ce récepteur est très faiblement exprimé au niveau ARNm, ce récepteur ne sera donc pas étudié plus en profondeur au cours des expériences suivantes.

4.3.2. Etude de l'inhibition de l'expression des trois récepteurs candidats dans les cellules cancéreuses A549 et HepG2

Après avoir étudié l'expression des différents récepteurs dans les deux lignées cellulaires cancéreuses A549 et HepG2 et, montré que les cellules A549 exprimaient la galectine-3, le CD44 et le CD168 tandis que les cellules HepG2 exprimaient la galectine-3 et le CD168, nous avons voulu inhiber leur expression par des siRNAs afin d'étudier l'effet de cette invalidation sur la cytotoxicité cellulaire induite par les fragments pectiques.

Premièrement, nous avons vérifié que les siRNAs inhibaient spécifiquement les protéines cibles. Afin de vérifier cela, une qPCR a été réalisée. Les cellules A549 et HepG2 ont été transfectées pendant 24 heures en présence de siRNAs ciblant un récepteur à une concentration de 50 nM. Après la transfection, les cellules sont incubées en présence de milieu complet pendant 24 heures. Après l'incubation, des extraits d'ARNm ont été récoltés et dosés. L'ARNm est rétro-transcrit en ADNc et les niveaux d'abondance en ARNm de la galectine-3, de CD44 et de CD168 ont été mesurés par qPCR en utilisant 23 kDa comme gène housekeeping.

Dans le cas des cellules HepG2, nous avons étudié l'expression en ARNm de la galectine-3 et du CD168 (CD44 n'étant pas exprimé dans cette lignée cellulaire, comme vu précédemment). Nous observons qu'il y a une nette diminution d'expression de la galectine-3 et de CD168 lorsque les cellules sont respectivement, transfectées en présence de siRNAs

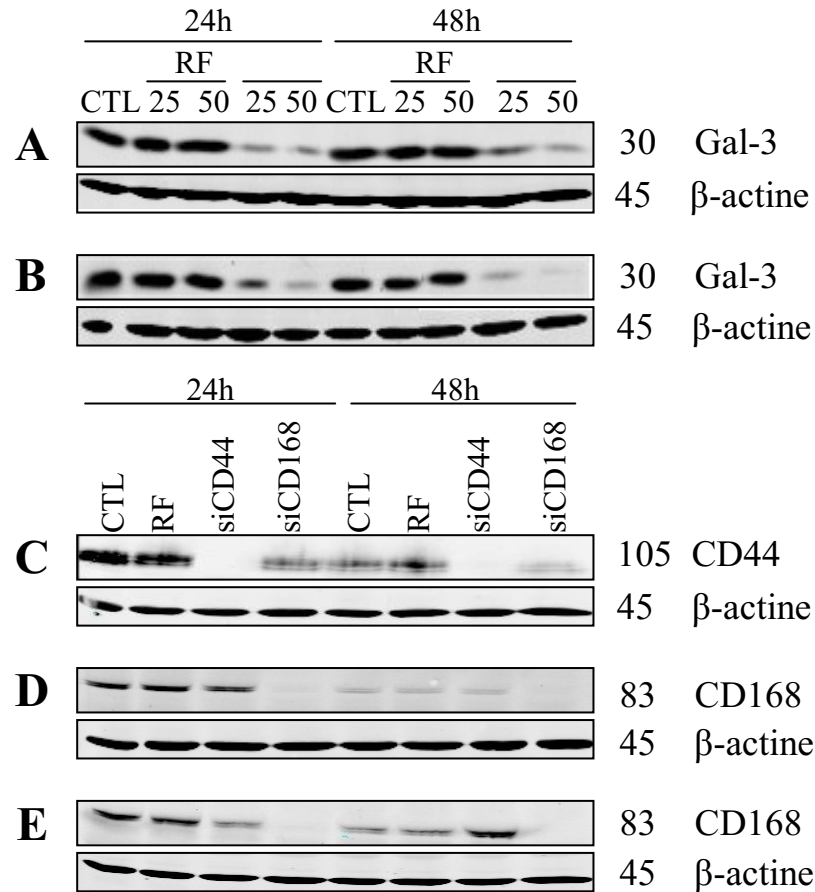


Figure 4.16 : Effet des siRNAs sur l'abondance protéique des trois récepteurs candidats dans les deux lignées cellulaires, A549 et HepG2. Les cellules HepG2 (A, D) ou les cellules A549 (B, C, E) ont été transfectées pendant 24 heures en présence de siRNAs ciblant un récepteur à une concentration de 50 nM (25 et 50 nM pour la galectine-3). Après la transfection, les cellules sont incubées en présence de milieu complet pendant 24 et 48 heures. Après l'incubation, des extraits protéiques totaux ont été récoltés et séparés par électrophorèse. L'abondance protéique de la galectine-3 (A, B), de CD44 (C) et de CD168 (D, E) a été mesurée par western blot. La β-actine a été utilisée comme contrôle de charge.

ciblant la galectine-3 et le CD168, suggérant que l'expression de leur ARNm respectif est bien inhibée (**Figure 4.15A**).

Dans le cas des cellules A549, nous observons également une diminution d'expression en ARNm des différents récepteurs lorsque les cellules sont transfectées avec les siRNAs correspondants, suggérant également l'inhibition de l'expression de l'ARNm ciblé. Cependant, nous remarquons des effets aspécifiques non explicables. Par exemple, nous remarquons une augmentation d'expression de la galectine-3 lorsque l'expression du CD168 est inhibée. De plus, une diminution d'expression relative du CD44 est notée lorsque nous inhibons spécifiquement l'expression de la galectine-3 ou du CD168. Le siRNA contrôle négatif (Risc Free) a également eu un effet non spécifique puisqu'il a augmenté de plus de 50% l'expression en ARNm des trois récepteurs candidats. Cette expérience devra être refaite afin de vérifier la reproductibilité de ces effets non désirés (**Figure 4.15B**).

Après avoir étudié l'expression en ARNm et montré que les siRNAs inhibaient l'expression en ARNm des protéines cibles, nous avons analysé l'expression protéique des différents récepteurs lorsque les cellules A549 et HepG2 sont transfectées avec les siRNAs correspondants au récepteur ciblé. Pour cela, les cellules A549 et HepG2 ont été transfectées pendant 24 ou 48 heures en présence de siRNAs ciblant un récepteur particulier à une concentration de 50 nM (et 25 nM pour la galectine-3). Après la transfection, les cellules sont incubées en présence de milieu complet pendant 24 heures. Après l'incubation, des extraits protéiques totaux sont récoltés et dosés. Enfin, 20 µg de protéines sont chargés sur un gel de polyacrylamide et transférés sur une membrane PVDF. Les différents récepteurs sont alors révélés, ainsi que la β -actine utilisée comme contrôle de charge.

Dans le cas des cellules HepG2, pour la galectine-3, deux concentrations de siRNAs ont été testées, 25 et 50 nM. Nous observons que lorsque les cellules HepG2 sont transfectées en présence des siRNAs pendant 24 ou 48 heures, il y a une diminution d'abondance de la protéine ciblée par le siRNA par rapport aux cellules non transfectées ou celles transfectées avec le contrôle négatif, le Risc Free. De plus, cette diminution d'expression protéique est plus importante à la concentration de 50 nM, c'est pourquoi cette concentration sera utilisée pour la suite des expériences (**Figure 4.16A**). L'expression de la galectine-3 est donc inhibée par les siRNAs. En ce qui concerne le CD168, son abondance protéique diminue après 24 et 48 heures lorsque les cellules HepG2 sont transfectées avec le siRNA inhibant le CD168 par rapport aux cellules non transfectées ou transfectées avec le Risc Free, suggérant que l'expression du CD168 est bien inhibée par le siRNA (**Figure 4.16D**).

Dans le cas des cellules A549, pour la galectine-3, deux concentrations de siRNAs ont également été testées, 25 et 50 nM. Nous observons que lorsque les cellules A549 sont transfectées en présence des siRNAs pendant 24 ou 48 heures, il y a une diminution d'abondance de la protéine ciblée par le siRNA, également plus importante à la concentration de 50 nM, par rapport aux cellules non transfectées ou celles transfectées avec le contrôle négatif, le Risc Free (**Figure 4.16B**). Ce résultat suggère que l'expression de la galectine-3 est bien inhibée par le siRNA. Pour le CD44, nous observons également une diminution de son abondance lorsque les cellules A549 sont transfectées en présence du siRNA pendant 24 ou 48 heures par rapport aux cellules non transfectées ou celles transfectées avec le Risc Free, suggérant que son expression protéique est inhibée par le siRNA (**Figure 4.16C**). En ce qui concerne le CD168, son expression diminue aussi après transfection par siRNA pendant 24 et 48 heures par rapport aux cellules non transfectées ou celles transfectées avec le Risc Free (**Figure 4.16E**). Il est important de noter que la diminution d'abondance d'expression des différents récepteurs est la même après 24 et 48 heures, c'est pourquoi dans les expériences suivantes, nous transfectons les cellules pendant 24 heures.

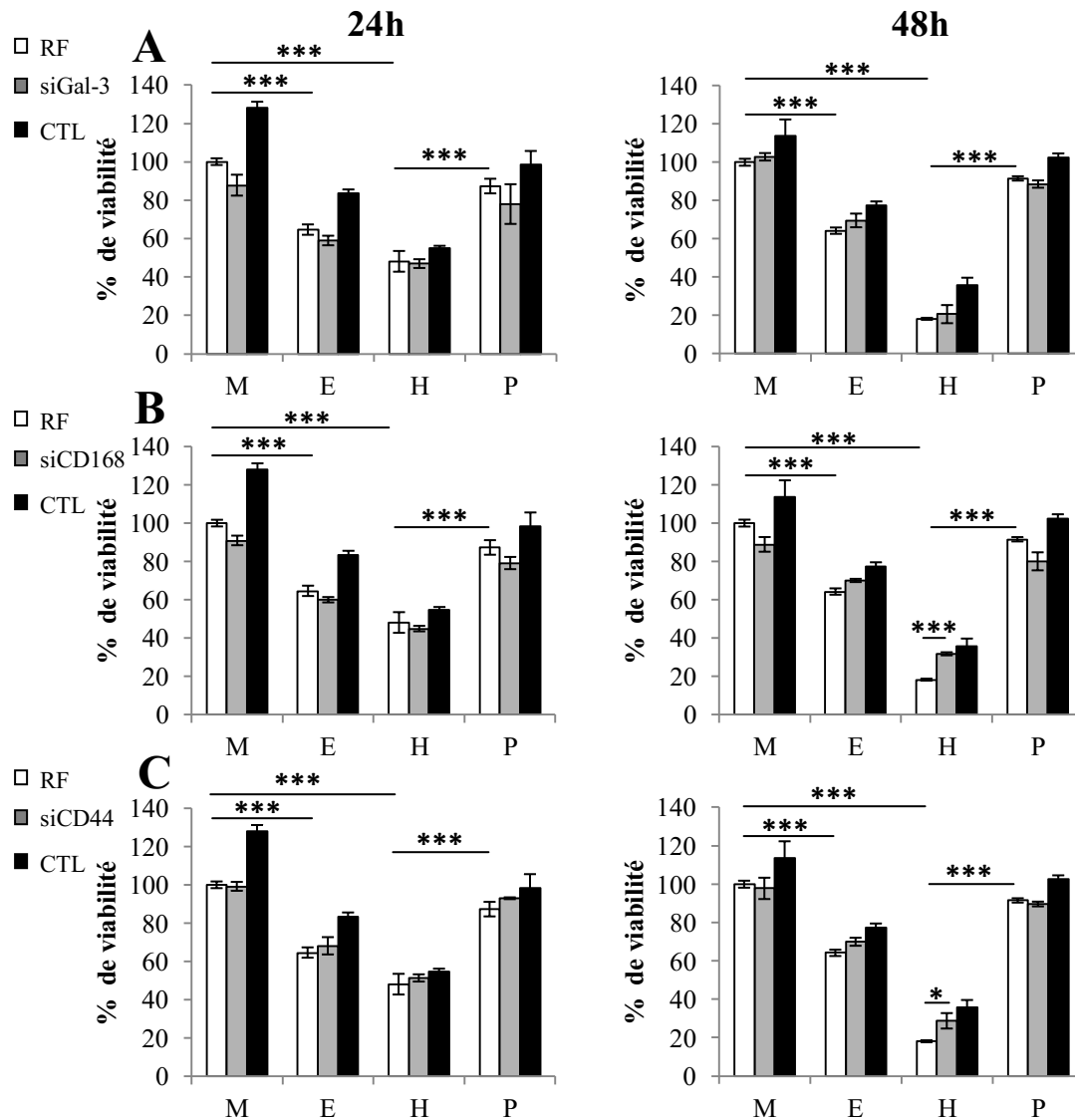


Figure 4.17 : Effet des siRNAs inhibant l'expression des récepteurs galectine-3, CD168 et CD44 sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses HepG2 en présence d'HFCP. Les cellules HepG2 sont transfectées pendant 24 heures avec les siRNAs ciblant la galectine-3 (A), le CD168 (B), ou le CD44 (C) ou avec des siRNAs Risc Free comme contrôle négatif. Les CTL sont des cellules non transfectées. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 (gauche) et 48 (droite) heures en présence de milieu seul (M), d'étoposide à 50 μ M (E), de pectine fragmentée à 3 mg/mL (H), ou de pectine de citrus à 3 mg/mL (P). Après l'incubation, la viabilité cellulaire a été mesurée en réalisant un test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). (*= P <0,05, **= P <0,01, ***= P <0,001 selon une analyse ANOVA 2).

Ainsi, nous observons, par qPCR et western blot, que l'expression des différents récepteurs étudiés est bien inhibée par leur siRNA respectif.

4.3.3. Etude de la cytotoxicité cellulaire induite par les fragments pectiques dans les cellules A549 et HepG2 en présence de siRNAs ciblant la galectine-3, le CD44 et le CD168

Après avoir montré que les siRNAs diminuaient l'expression des différents récepteurs étudiés, nous avons évalué l'effet de ces siRNAs sur la cytotoxicité cellulaire induite par les fragments pectiques. En effet, si les fragments pectiques sont reconnus par un de ces récepteurs et que ce récepteur est ensuite impliqué dans l'induction de la cytotoxicité, nous devrions constater une augmentation de la viabilité cellulaire lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP. Pour se faire, les cellules cancéreuses A549 et HepG2 sont transfectées pendant 24 heures en présence de siRNAs ciblant un récepteur particulier à une concentration de 50 nM (concentration et temps d'incubation mis au point au cours des expériences précédemment décrites). Après la transfection, les cellules sont incubées en présence de milieu complet frais pendant 24 heures. Ensuite, les cellules sont incubées pendant 24 ou 48 heures avec du milieu seul ou supplémenté d'étoposide, d'HFCP ou de pectine de citrus. Enfin, une mesure de la viabilité cellulaire a été réalisée afin d'évaluer le pourcentage de viabilité dans chacun des échantillons et de pouvoir analyser l'effet de l'inhibition de l'expression des récepteurs.

Dans le cas des cellules HepG2, lorsque les cellules sont transfectées en présence de siRNA ciblant la galectine-3, nous n'observons pas d'augmentation de la viabilité cellulaire quand les cellules sont incubées en présence des fragments pectiques peu importe le temps d'incubation, par rapport aux cellules transfectées avec le Risc Free (**Figure 4.17A**). Ainsi, il semblerait que la toxicité des fragments pectiques ne soit pas médiée par une reconnaissance de la galectine-3. Il faut noter que nous observons une viabilité cellulaire plus importante des cellules contrôles par rapport aux cellules transfectées et ce dans les différents milieux, ce qui montre que la transfection est assez toxique pour les cellules. Le deuxième récepteur étudié est le CD168. Après 24 heures d'incubation en présence d'HFCP, les cellules HepG2 transfectées avec des siRNAs ciblant ce récepteur, ne montrent pas d'augmentation de viabilité cellulaire par rapport aux cellules transfectées avec le Risc Free, suggérant que les fragments pectiques n'agissent pas par le CD168 de manière précoce. Néanmoins, de manière intéressante, après 48 heures d'incubation en présence d'HFCP, nous observons une augmentation de la viabilité cellulaire qui est très hautement significative par un test ANOVA 2 (**Figure 4.17B**). Ce résultat suggérerait que le CD168 reconnaît les fragments pectiques de manière tardive. Enfin, nous avons quand même testé le dernier récepteur, le CD44. Nous n'observons pas d'augmentation de la viabilité cellulaire quand les cellules HepG2 sont transfectées avec des siRNAs ciblant ce récepteur et incubées pendant 24 heures en présence d'HFCP. Ce résultat suggère que les fragments pectiques n'agissent pas par le CD44 de manière précoce. Néanmoins, après 48 heures d'incubation en présence d'HFCP, nous observons une légère augmentation, également statistiquement significative, indiquant que les fragments seraient aussi reconnus par le CD44 (**Figure 4.17C**). Cependant, ce dernier résultat est surprenant. En effet, comme nous l'avons montré ci-dessus par qPCR, immunofluorescence et western blot, ce récepteur semble ne pas être exprimé dans les cellules HepG2 contrôles.

Dans le cas des cellules A549, lorsque les cellules sont transfectées pendant 24 heures en présence de siRNA ciblant la galectine-3 et incubées pendant 24 ou 48 heures en présence des fragments pectiques, nous n'observons pas d'augmentation de la viabilité cellulaire par rapport aux cellules transfectées avec le Risc Free (**Figure 4.18A**). Ainsi, il semblerait que la

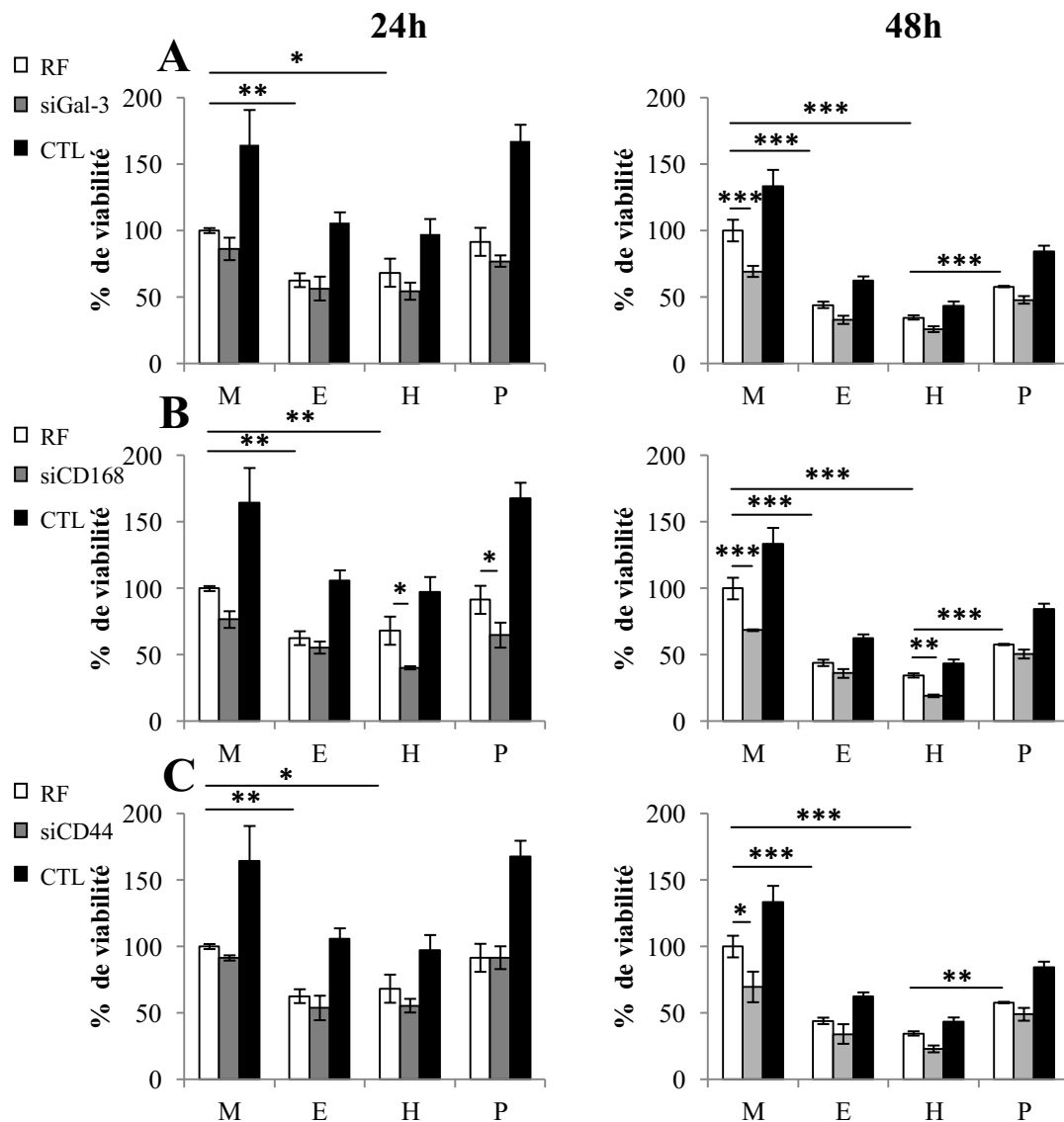


Figure 4.18 : Effet des siRNAs inhibant l'expression des récepteurs galectine-3, CD168 et CD44 sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses A549 en présence d'HFCP. Les cellules A549 sont transfectées pendant 24 heures avec les siRNAs ciblant la galectine-3 (A), le CD168 (B), ou le CD44 (C) ou avec des siRNAs Risc Free comme contrôle négatif. Les CTL sont des cellules non transfectées. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 (gauche) et 48 (droite) heures en présence de milieu seul (M), d'étoposide à 50 μ M (E), de pectine fragmentée à 3 mg/mL (H), ou de pectine de citrous à 3 mg/mL (P). Après l'incubation, la viabilité cellulaire a été mesurée en réalisant un test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3). (*= $P<0,05$, **= $P<0,01$, ***= $P<0,001$ selon une analyse ANOVA 2).

toxicité des fragments pectiques dans les cellules A549 n'est pas médiée par la galectine-3, comme c'est le cas dans les cellules HepG2. Nous observons également une viabilité cellulaire plus importante des cellules CTL par rapport aux cellules transfectées et ce dans les différents milieux, ce qui montre que la transfection est assez toxique pour les cellules A549. Pour le CD168, après 24 et 48 heures d'incubation en présence d'HFCP, les cellules A549 transfectées avec des siRNAs ciblant ce récepteur ne montrent pas d'augmentation de viabilité cellulaire par rapport aux cellules transfectées avec le Risc Free, suggérant que le CD168 n'est pas impliqué dans les effets cytotoxiques des fragments pectiques (**Figure 4.18B**). Pour le dernier récepteur étudié, le CD44, nous n'observons pas d'augmentation de la viabilité cellulaire quand les cellules A549 sont transfectées avec des siRNAs ciblant ce récepteur et incubées pendant 24 et 48 heures en présence d'HFCP (**Figure 4.18C**). Ce résultat suggère que les fragments pectiques n'induisent pas leur effet cytotoxique via le CD44. Cependant, de manière intéressante, lorsque les cellules sont transfectées avec les différents siRNAs, nous observons l'effet inverse de celui attendu, c'est-à-dire, une diminution de la viabilité cellulaire. Ce résultat est plus marqué après 48 heures d'incubation. Ce résultat suggère que l'inhibition de l'expression de ces récepteurs est toxique pour les cellules A549 : ils sont donc nécessaires à leur survie.

Pour conclure cette deuxième partie dont le but était de déterminer les récepteurs par lesquels les fragments pectiques étaient reconnus, nous avons étudié quatre récepteurs candidats : la galectine-3 connue pour reconnaître la pectine fragmentée par hydrolyse acide, et, les récepteurs CD44, CD168 et TLR-4 connus pour reconnaître l'acide hyaluronique, un polysaccharide présent dans la MEC. La pectine étant composée de polysaccharides et principalement d'acide galacturonique, ces récepteurs pourraient être de bons candidats potentiels. Nous avons, tout d'abord, vérifié l'expression en ARNm et en protéines de ces récepteurs dans les deux lignées cellulaires étudiées. Dans les cellules HepG2, l'ARNm et les protéines galectine-3 et CD168 sont exprimés. Le récepteur CD44 n'est pas exprimé tandis que le TLR-4 l'est très faiblement. Dans les cellules A549, nous mettons en évidence l'expression en ARNm et en protéine de la galectine-3, du CD44 et du CD168. Le TLR-4 est également très faiblement exprimé, c'est pourquoi le rôle de ce récepteur n'a pas été étudié dans les expériences suivantes. Ensuite, afin de montrer leur effet possible ou non dans la reconnaissance des fragments pectiques, nous avons inhibé l'expression de ces récepteurs candidats par des siRNAs. Nous avons vérifié l'invalidation de l'expression en ARNm par qPCR et montré l'inhibition de l'expression de la galectine-3 et du CD168 dans les cellules HepG2. Dans les cellules A549, nous avons également montré l'inhibition de l'expression de la galectine-3, du CD44 et du CD168. Après, nous avons vérifié l'inhibition d'expression au niveau protéique et nous avons montré que l'expression de la galectine-3 et du CD44 est inhibée dans les cellules HepG2 et que l'expression de la galectine-3, du CD44 et du CD168 est inhibée dans les cellules A549. Enfin, nous avons étudié l'effet qu'avait cette invalidation des divers récepteurs sur la cytotoxicité cellulaire. Nous avons montré, dans les cellules HepG2, que la galectine-3 n'intervenait pas dans l'effet cytotoxique des fragments pectiques quel que soit le temps d'incubation. Pour le CD168, nous observons une augmentation de la viabilité cellulaire après 48 heures, suggérant que les fragments pectiques pourraient être reconnus par ce récepteur. Nous obtenons, cependant, un résultat étonnant pour le CD44. En effet, son inhibition semblerait augmenter la viabilité cellulaire lorsque les cellules sont incubées en présence des fragments, suggérant que ces derniers seraient reconnus par ce récepteur or, comme décrit ci-dessus, nous ne détectons pas son expression dans les cellules HepG2. Comme mentionné dans l'introduction, CD168 interagit avec CD44 afin de transduire son signal car il ne possède pas de domaine transmembranaire. Il se pourrait que lorsqu'il y a interaction entre ces deux récepteurs lors de la reconnaissance d'un ligand (HFCP) par le

		HepG2				A549			
		Gal-3	CD44	CD168	TLR-4	Gal-3	CD44	CD168	TLR-4
ARNm		+	-	+	-	+	+	+	-
Protéine	WB	+	-	+	-	+	+	+	-
	IF	+	-	/	-	+	+	/	-

Figure 4.19 : Tableau récapitulatif de l'expression en ARNm et en protéines des différents récepteurs étudiés dans les cellules cancéreuses A549 et HepG2 (+ = détection de l'ARNm ou de la protéine, - = pas de détection de l'ARNm ou de la protéine, / = anticorps non compatible avec l'immunofluorescence).

		HepG2				A549			
		Gal-3	CD44	CD168	TLR-4	Gal-3	CD44	CD168	TLR-4
siRNA	ARNm	+	/	+	X	+	+	+	X
	Protéine	+	/	+	X	+	+	+	X
siRNA MTT		-	?	?	X	-	-	-	X

Figure 4.20 : Tableau récapitulatif de l'inhibition par siRNAs des différents récepteurs candidats et de l'effet des siRNAs sur la cytotoxicité cellulaire induite par les fragments pectiques dans les cellules cancéreuses A549 et HepG2 (+ = inhibition au niveau ARNm et protéique des différents récepteurs par les siRNAs, - = pas d'effet des siRNAs sur la diminution de viabilité cellulaire, ? = effet possible des siRNAs sur la diminution de viabilité cellulaire, X = siRNA non testé, / = pas de détection de la protéine en western blot).

CD168, ce signal induit la transcription de CD44, qui serait alors recruté en membrane afin de jouer un rôle dans l'effet cytotoxique des fragments pectiques. Cet effet serait alors visible lorsque les cellules sont incubées en présence de siRNAs. Dans le cas des cellules A549, la galectine-3, le CD168 et le CD44 ne semblent pas être impliqués dans la reconnaissance des fragments pectiques. Néanmoins, lorsque les cellules sont transfectées en présence des différents siRNAs, nous observons que ces inhibitions sont toxiques pour les cellules, suggérant que ces protéines sont importantes pour la survie des cellules A549. Nous n'avons donc pas réussi à identifier un récepteur reconnaissant les fragments pectiques dans les cellules A549. Ces résultats sont repris dans un tableau récapitulatif (**Figure 4.19**).

Discussion et conclusions

5. Discussion et conclusions

A l'heure actuelle, le cancer représente la maladie la plus mortelle à travers le monde. Cette pathologie possède également le taux d'incidence le plus élevé. En effet, en 2008, 7,6 millions de décès et 12,7 millions de diagnostics ont été répertoriés à travers le Monde. Ces chiffres augmentent d'année en année dû notamment au vieillissement de la population et à l'adoption de multiples comportements favorisant l'apparition de cancers tels la cigarette et l'alimentation « occidentalisée ».

Selon Hanahan et Weinberg (2011), les cellules tumorales résultent d'une manifestation de dix altérations essentielles qui, ensemble, dictent la croissance tumorale : l'auto-suffisance vis-à-vis des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, l'échappement à la mort cellulaire programmée ou l'apoptose, le potentiel réplicatif illimité, la capacité à stimuler l'angiogenèse, l'invasion tissulaire et les métastases, l'instabilité génomique, l'inflammation, la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire (Hanahan et Weinberg, 2011).

En plus de la recherche sur le mécanisme du développement tumoral, la recherche de nouvelles thérapies luttant contre le cancer est aussi un domaine très étudié. De nombreuses avancées y ont d'ailleurs été faites ces dernières années. En plus de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie existantes, les scientifiques se sont intéressés à l'utilisation de molécules naturelles, notamment issues de plantes, comme les pectines. Les pectines sont des polysaccharides complexes issus de la paroi des cellules végétales. Ces sucres sont capables de réduire le taux de cholestérol des patients souffrant d'hypercholestérolémie. Cependant, de nouvelles propriétés bien plus intéressantes ont vu le jour lorsque la pectine était fragmentée. Cette fragmentation se fait par des modifications de pH ou de température, ou par digestion enzymatique.

La pectine fragmentée par pH, nommée MCP pour modified-citrus pectin, augmente l'excrétion urinaire et fécale de métaux toxiques (Zhao et al., 2008, Eliaz et al., 2006) mais de façon bien plus intéressante, elle exerce de nombreux effets anticancéreux *in vitro* mais également *in vivo* (Nangia-Makker et al., 2002, Inohara et Raz, 1994, Chauhan et al., 2005, Liu et al., 2008). Il semblerait que la MCP induise la mort cellulaire via la voie de l'apoptose dépendante de la caspase-3 (Yan et Katz, 2010). De plus, il a également été montré que les fragments générés par variation de pH, riches en résidus galactoses, ont une forte affinité pour la galectine-3 (Gunning et al., 2009, Inohara et Raz, 1994, Sathisha et al., 2007, Glinsky et Raz, 2009). En ce qui concerne la pectine fragmentée par la chaleur (HFCEP), très peu d'études ont été réalisées jusqu'à présent. Selon Jackson et son équipe, le processus de mort cellulaire induit par les fragments serait de l'apoptose. Cependant, les cellules LNCap utilisées pour cette étude n'expriment pas la Gal-3, suggérant que les effets apoptotiques sont médiés par des mécanismes indépendants de la Gal-3 (Jackson et al., 2007).

Ainsi, dans ce mémoire, nous avons tenté de caractériser le type de mort cellulaire induit par les fragments pectiques mais également de déterminer par quel récepteur sont reconnus les fragments pectiques, dans deux lignées de cellules tumorales, les cellules A549 dérivant d'un adénocarcinome pulmonaire humain et les cellules HepG2, dérivant d'un hépatocarcinome humain. Nous avons utilisé l'étoposide, un agent utilisé en chimiothérapie anticancéreuse, comme contrôle positif induisant la mort cellulaire et le milieu seul comme contrôle négatif. La pectine de citrus non fragmentée a été également étudiée mais n'induit pas de mort cellulaire.

5.1. Caractérisation du type de mort cellulaire induit

Tout d'abord, nous avons montré que la pectine de citrus fragmentée à la chaleur (HFCP) avait un effet cytotoxique marqué et statistiquement significatif dans les cellules cancéreuses A549 et HepG2. Ceci a été montré en évaluant à la fois la cytotoxicité cellulaire par une mesure du relargage de la LDH et la viabilité cellulaire par une mesure de l'activité métabolique des cellules. L'induction de la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses incubées en présence de HFCP avait été également montrée par Jackson et al en 2007. Nous avons aussi montré que l'effet cytotoxique induit par la HFCP était beaucoup plus important que celui provoqué par l'étoposide, lui procurant un grand intérêt thérapeutique.

Dans des études réalisées précédemment au laboratoire, il avait été montré que la HFCP ne possédait que peu d'effet cytotoxique sur une souche de cellules non cancéreuses humaines, les fibroblastes BJ-1, suggérant que la pectine fragmentée n'exerce un effet cytotoxique que dans les cellules cancéreuses. Ce résultat est très intéressant dans le but d'utiliser la pectine fragmentée comme stratégie thérapeutique chez des patients atteints du cancer sans induire d'effets secondaires sur les tissus sains. Il a également été montré que l'effet cytotoxique de la HFCP sur les cellules HepG2 se faisait indépendamment de la présence de sérum dans le milieu. Ainsi, dans le but d'utiliser la pectine fragmentée comme moyen thérapeutique pour lutter contre le cancer, ce résultat était très intéressant car la présence de sérum *in vitro* mime l'environnement cellulaire retrouvé *in vivo*. Il arrive souvent que certaines molécules aient un effet en absence de sérum mais qu'elles le perdent en présence de sérum car le sérum contient de nombreux facteurs de croissance et des cytokines capables d'inhiber l'apoptose et de protéger alors les cellules. Ainsi, l'efficacité de fragments pectiques en présence de sérum se révèle être d'un réel intérêt.

Afin de déterminer le type de mort cellulaire induit par ces fragments dans les deux lignées de cellules cancéreuses, nous avons testé diverses molécules inhibitrices de l'apoptose dépendante des caspases, de l'autophagie ou de la nécroptose et mesuré la cytotoxicité et la viabilité cellulaires après 24 et 48 heures d'incubation. Nous allons résumer les différents résultats obtenus et développer leur implication éventuelle dans la mort des cellules cancéreuses induite par la HFCP.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'apoptose dépendante des caspases. Nous avons, pour cela, étudié l'influence d'un inhibiteur des caspases, le Z-VAD, sur la mort cellulaire. Cette molécule se lie irréversiblement au site catalytique des caspases, les rendant inactives, empêchant l'apoptose de se mettre en place. Lorsque les cellules HepG2 sont incubées en présence d'étoposide ou de pectine fragmentée, il semblerait que la mort cellulaire induite ne soit pas de l'apoptose dépendante des caspases car nous n'observons pas de diminution de la cytotoxicité ou d'augmentation de la viabilité en présence de cet inhibiteur. Cependant, dans le cas des cellules A549, il se pourrait que la mort cellulaire induite par l'étoposide se fasse via la voie de l'apoptose dépendante des caspases car cet inhibiteur diminue statistiquement la cytotoxicité induite par cet agent toxique. Lorsque nous mesurons la viabilité cellulaire, nous observons une tendance vers une augmentation qui n'est cependant pas statistiquement significative par un test ANOVA 2. Lorsque les cellules A549 sont incubées en présence d'HFCP, il semblerait que la mort cellulaire ne soit pas de l'apoptose dépendante des caspases car nous n'observons pas de diminution de la cytotoxicité ou d'augmentation de la viabilité en présence de cet inhibiteur.

Les résultats obtenus pour les cellules HepG2 sont en accord avec ceux obtenus précédemment dans le laboratoire. En effet, le Z-VAD n'avait aucune influence sur la mort cellulaire induite par HFCP. Cependant, il avait également été observé un clivage de la

protéine PARP, un substrat des caspases effectrices, suggérant que l'apoptose dépendante des caspases était activée dans ces cellules, comme le suggéraient Jackson et al. en 2007 dans les cellules LNCap. En parallèle, la caspase-3 était clivée lorsque les cellules étaient incubées en présence de pectine fragmentée, suggérant également une mort cellulaire par apoptose (mémoire de François Côte). Toutefois, certains fragments de la caspase-3 migraient à des poids moléculaires différents des poids moléculaires des fragments obtenus habituellement. L'explication possible a été que les fragments étaient modifiés avant ou après le clivage. Afin de voir si ces fragments générés étaient actifs, une mesure de l'activité de la caspase-3 a été réalisée, qui s'est révélée négative. Une hypothèse avait alors été émise afin d'expliquer l'absence d'activité des fragments : les fragments issus du clivage de la caspase-3 seraient modifiés par une phosphorylation. Ce résultat avait déjà été observé auparavant et rendait l'enzyme inactive (Alvarado-Kristensson et Andersson, 2005). Cependant, en incubant les extraits protéiques avec une phosphatase (protéine λ) qui déphosphoryle les protéines présentes dans l'échantillon, le profil de migration des différents fragments reste le même, suggérant que les fragments ne sont pas modifiés par des phosphorylations. Toutefois, les fragments peuvent être modifiés par d'autres groupements tels que les acétylations, les méthylations ou encore les alkylations. Il serait donc intéressant d'étudier ces autres modifications possibles.

En ce qui concerne les cellules A549, les résultats obtenus ne concordent pas avec ceux obtenus précédemment. En effet, il avait été observé auparavant que le Z-VAD induisait une diminution de la cytotoxicité, suggérant que l'apoptose dépendante des caspases était impliquée dans la mort cellulaire induite par les fragments pectiques. Ce résultat concordait avec le clivage de PARP, le clivage de la caspase-3 (poids moléculaires également différents des habituels et protéine λ ne change pas les profils de migration) et une forte activité de la caspase-3.

Ainsi, il semblerait que la voie de l'apoptose dépendante des caspases soit activée dans les deux types cellulaires mais lorsque nous inhibons cette voie avec un inhibiteur de caspases, nous n'observons aucune augmentation de viabilité cellulaire ou de diminution de la cytotoxicité cellulaire. Cependant, comme mentionné dans la revue de Challa et de Chan, l'inhibition des caspases augmente la sensibilité des cellules à induire la nécroptose via le récepteur au TNF (Challa et Chan, 2010). Ainsi, il y aurait un switch entre les deux voies, et la nécroptose prendrait le relais dans la mort cellulaire. Il serait donc intéressant d'inhiber ce récepteur (TNFR-1) et d'en étudier l'effet sur la cytotoxicité cellulaire induite par les fragments pectiques, comme nous le détaillerons ci-dessous. De plus, une autre hypothèse serait que la concentration en Z-VAD n'était pas assez élevée pour inhiber complètement les caspases, par conséquent, la voie de l'apoptose dépendante des caspases n'a pas non plus été entièrement inhibée. Il serait donc intéressant de mettre au point la meilleure concentration possible qui empêche la voie de l'apoptose dépendante des caspases de se mettre en place sans être toxique pour les cellules. Cette courbe de concentration se ferait sur les cellules A549 incubées en présence d'étoposide pendant 48 heures car c'est dans ces conditions que les marqueurs de l'apoptose dépendante des caspases ont été mis en évidence.

En plus de la voie dépendante des caspases, il existe une voie indépendante des caspases, comme mentionné au point 1.2.3b. Des résultats précédents du laboratoire ont montré que la pectine fragmentée n'induisait pas de translocation nucléaire d'AIF dans les cellules A549, suggérant qu'AIF n'est pas activé et concordant avec les résultats précédents. Ce résultat a également été observé dans les cellules HepG2. La localisation de l'endonucléase G, une autre molécule libérée lors de la MOMP, pourrait également être investiguée. Si nous observons une translocation nucléaire, il se pourrait que l'apoptose se fasse par une voie dépendante d'autres protéases, comme les calpaïnes ou les cathepsines.

Afin de savoir s'il y a de l'apoptose ou non dans les cellules A549, il serait intéressant de localiser la protéine Bax. En absence d'apoptose, Bax se trouve sous forme cytosolique mais lorsque l'apoptose est déclenchée, cette protéine est transloquée au niveau de la membrane mitochondriale externe afin de s'oligomériser et de former des canaux qui permettent l'échappement de nombreuses protéines apoptogéniques de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol, comme le cytochrome c. Il serait alors également intéressant de mettre en évidence la localisation du cytochrome c. En effet, s'il se trouve dans le cytoplasme, l'apoptose est alors enclenchée. On pourrait croire que ces expériences mettent surtout en avant la voie de l'apoptose intrinsèque or, il est à noter que dans la voie de l'apoptose extrinsèque, le complexe DISC peut également faire intervenir la mitochondrie afin de déclencher l'apoptose via la protéine Bid clivée, menant à la dysfonction mitochondriale (MOMP) et à la formation de l'apoptosome.

Ainsi, si nous mettons en évidence l'activation de l'apoptose, il serait intéressant de savoir si elle se fait par la voie intrinsèque ou extrinsèque. Pour cela, afin d'étudier la voie extrinsèque, l'inhibition de l'expression de FADD par des siRNAs semble intéressante. En effet, si nous observons plus de viabilité lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP et transfectées avec le siRNA ciblant FADD, il se pourrait que l'apoptose extrinsèque soit impliquée dans la mort cellulaire. Afin d'étudier la voie intrinsèque, il serait intéressant de s'attarder sur la protéine Bcl-2, d'inhiber son expression avec des siRNAs et d'en évaluer l'effet sur la cytotoxicité cellulaire.

Yan et Katz (2010) ont évalué l'effet cytotoxique de la MCP en étudiant ERK1/2, une protéine de la voie des MAPK qui est une voie de prolifération cellulaire et de survie. Ils ont montré que la MCP supprimait la signalisation via les MAPK car une diminution de l'abondance des formes phosphorylées d'ERK1/2 a été observée. Ils ont également remarqué une augmentation de l'abondance de la protéine pro-apoptotique Bim qui est ciblée par ERK1/2 via des phosphorylations permettant sa dégradation protéasomale. Ces résultats suggèrent que la MCP induit son effet cytotoxique via l'inhibition de la voie de signalisation MAPK, activant ainsi la voie de l'apoptose. Il serait donc également intéressant d'évaluer les niveaux d'expression d'ERK1/2 et de Bim en présence d'HFCP dans nos conditions expérimentales.

Après avoir étudié la voie de l'apoptose, nous avons ensuite étudié la voie de l'autophagie. Nous avons, pour cela, étudié l'influence de deux inhibiteurs de l'autophagie, la bafilomycine et la 3-méthyladénine, sur la mort cellulaire induite par les fragments pectiques. La première molécule inhibe la pompe à protons ATPase tandis que la deuxième inhibe la PI3K empêchant ainsi la formation de l'autophagosome.

La bafilomycine est toxique seule car dans le contrôle négatif (milieu seul), la viabilité cellulaire est très hautement significativement diminuée quand les cellules sont incubées en présence de la bafilomycine par rapport aux cellules incubées en absence de cette molécule, suggérant une trop forte concentration de la molécule. Lors du test de cytotoxicité cellulaire, nous avons montré que la molécule est également toxique seule et ce dans tous les milieux. Il est donc très difficile d'interpréter les résultats quant à son effet en présence d'HFCP ou d'étoposide. Dans le cas des cellules A549, on ne peut pas non plus interpréter l'effet de la bafilomycine sur la mort induite par l'étoposide ou l'HFCP car la molécule est encore plus toxique seule que dans les cellules HepG2. Il serait donc intéressant de faire une courbe de concentration afin d'ajuster au mieux la concentration afin d'éviter la toxicité de la molécule et de recommencer l'expérience avec cette nouvelle concentration.

Lors de l'utilisation de la 3-méthyladénine, dans les cellules HepG2, nous remarquons une légère tendance non statistique à l'augmentation de la viabilité lorsque les cellules sont incubées en présence d'étoposide, confirmant le résultat obtenu avec la bafilomycine. Néanmoins, l'autophagie ne semble pas être impliquée lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP. Dans le cas des cellules A549, nous observons une diminution non significative de viabilité cellulaire lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP supplémenté de 3-méthyladénine. Cependant, nous remarquons également une diminution de viabilité lorsque les cellules sont incubées en présence de milieu seul. Il semblerait donc que l'inhibition de l'autophagie en empêchant la formation de l'autophagosome soit toxique pour la cellule car les protéines et les organites s'accumulent dans la cellule car ils ne peuvent pas être englobés dans les autophagosomes pour être dégradés.

Des études réalisées précédemment au laboratoire avaient montré par analyse en western blot que l'abondance des formes LC3-I et LC3-II augmentait dans les cellules HepG2 et A549 incubées en présence de pectine fragmentée (mémoire de François Côte). Cette augmentation de LC3-I serait donc due à l'activation de l'autophagie tandis que l'augmentation de LC3-II, protéine qui se trouve en membrane autophagosomale, serait due à une augmentation de la quantité d'autophagosomes dans la cellule, suggérant aussi une activation de l'autophagie. En plus d'avoir étudié l'expression de LC3, sa localisation a été mise en évidence par marquage en immunofluorescence dans les cellules A549 incubées en présence d'HFCP. Une augmentation de la fraction LC3 présente dans des vésicules a été observée, confirmant les résultats précédents et correspondant à une activation de l'autophagie. Il serait intéressant de réaliser cette expérience avec les cellules HepG2. Ainsi, ces résultats montrent que les fragments pectiques induiraient l'activation de l'autophagie. L'initiation de l'autophagie est peut être induite par les fragments pectiques mais les autophagosomes ne fusionneraient pas avec les lysosomes, afin d'expliquer les résultats obtenus en incubant les cellules en présence de la 3-méthyladénine. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la bafilomycine à une concentration plus faible pour évaluer la présence ou l'absence d'initiation de l'autophagie lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP. Une autre molécule qui pourrait être utilisée est la chloroquine qui empêche également la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Yoon et al., 2010). Il serait également intéressant d'utiliser la microscopie électronique à transmission afin de visualiser la présence ou non de structures relatives à l'autophagie comme les autophagosomes.

De plus, il est intéressant de noter que l'inhibition de l'autophagie par l'inhibition de la pompe à proton ATPase est toxique car cette pompe n'est pas présente uniquement au niveau des vésicules lysosomales mais également dans la chaîne mitochondriale respiratoire, qui peut alors aussi être inhibée, induisant également la mort cellulaire. De plus, si les lysosomes sont non fonctionnels, les protéines et les organites ne peuvent plus être dégradés et s'accumulent dans la cellule qui devient alors moins fonctionnelle. Il est donc essentiel d'inhiber plus spécifiquement l'autophagie en utilisant, par exemple, des siRNAs ciblant l'Atg5, l'Atg12 ou LC3, qui sont des protéines impliquées dans l'élongation de la vésicule. En inhibant ces protéines, l'autophagie ne serait plus activée et si les cellules possèdent le même profil de mortalité lorsqu'elles sont incubées en présence de pectine fragmentée que celui des cellules transfectées avec le contrôle négatif, cela suggère que l'autophagie n'est pas impliquée dans le processus de mort cellulaire. Néanmoins, si l'autophagie participe à la mort cellulaire, les cellules dans lesquelles ces protéines sont invalidées devraient être protégées de la mort cellulaire provoquée par HFCP.

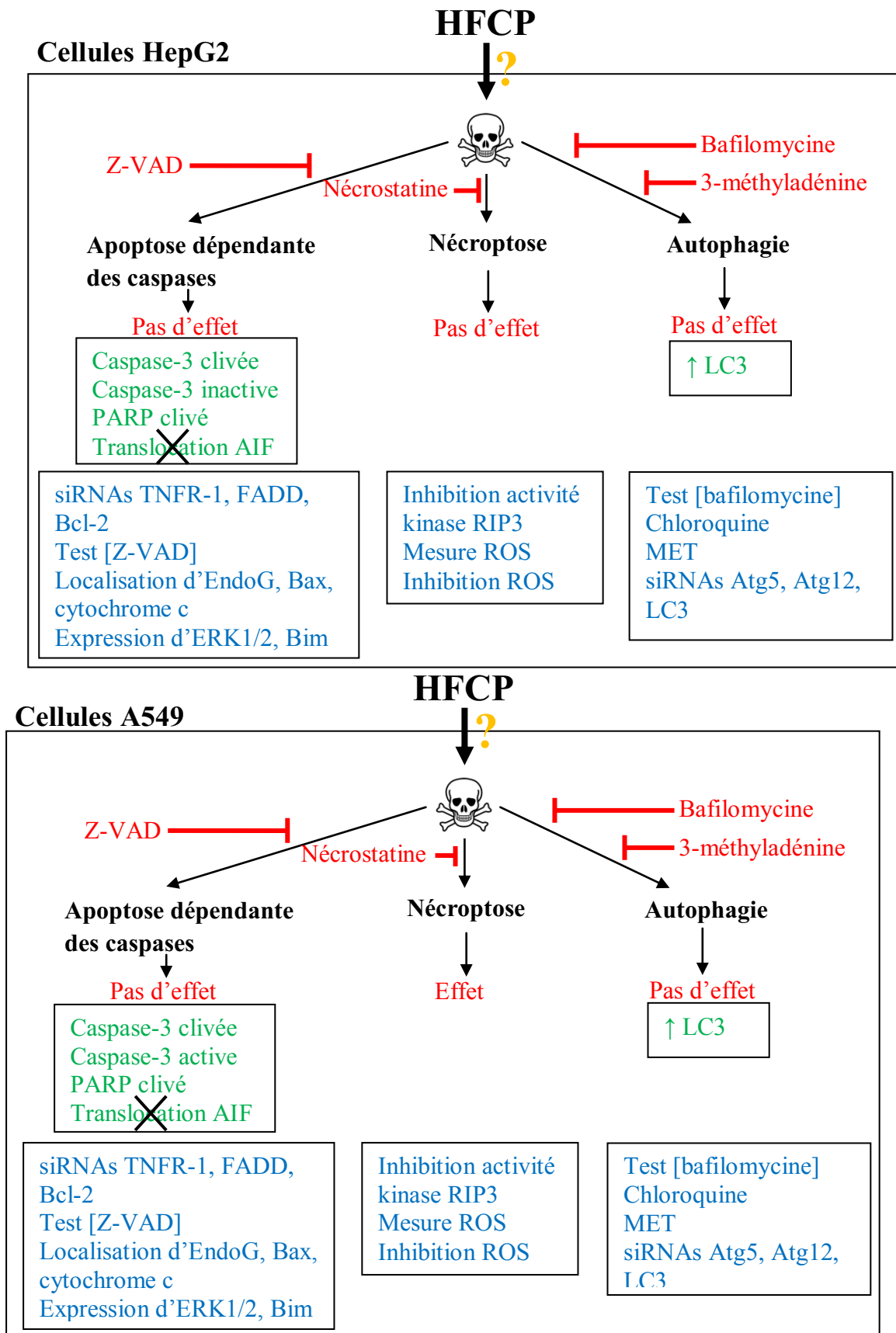


Figure 5.1 : Résumé du type de mort cellulaire induite par les fragments pectiques dans les deux types cellulaires cancéreux. En rouge = inhibition des différentes voies de mort cellulaire et effets décrits dans ce travail, en vert = résultats obtenus précédemment, en bleu = perspectives possibles.

Après avoir étudié l'apoptose dépendante des caspases et l'autophagie, nous nous sommes attardés sur le troisième type de mort cellulaire, la nécroptose. Nous avons, pour cela, étudié l'influence d'un inhibiteur de la nécroptose, la nécrostatine, sur la mort cellulaire induite par les fragments pectiques. Cet inhibiteur inhibe l'activité kinase de RIP1, une protéine essentielle à la mise en place de la nécroptose. Il semblerait que la nécroptose ne soit pas impliquée dans la mort cellulaire induite par l'étoposide ou les fragments pectiques dans les cellules HepG2. Dans les cellules A549, lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP, la nécrostatine diminue légèrement la cytotoxicité induite par cet agent toxique, suggérant que la nécroptose pourrait être impliquée dans le processus de mort cellulaire.

Comme mentionné précédemment, l'activité kinase de RIP3 est également requise pour mettre en place la nécroptose, ainsi il serait intéressant d'inhiber cette protéine ou d'invalider son expression et de voir l'effet de cette inhibition sur la mortalité cellulaire induite par l'HFCP.

De plus, comme mentionné précédemment, une production accrue de ROS serait à l'origine de la mise en place de la nécroptose. En effet, les ROS sont produits après la liaison du TNF à son récepteur. Il serait donc intéressant de mesurer la quantité de ROS lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP et de comparer cette quantité à celle obtenue lorsque les cellules sont incubées en présence de milieu seul. Si nous observons une augmentation de la quantité de ROS produite, cela suggérerait que la nécroptose joue un rôle dans le mécanisme de mort cellulaire induite par les fragments pectiques. Cette mesure de quantité de ROS se fait via la sonde fluorescente DCFHDA qui est sensible à l'H₂O₂. La fluorescence relative est alors mesurée à l'aide d'un fluorimètre (Mukherjee et Das, 2011). Si une augmentation est observée, il serait alors très intéressant d'inhiber les ROS via un antioxydant comme la N-acétylcystéine (NAC) (Zafarullah et al., 2003) et d'en évaluer l'effet sur la cytotoxicité induite par l'HFCP. La NAC inhibe l'activation des MAPK (c-Jun et p38) et de NF-κB.

En analysant l'ensemble de ces résultats, il est encore difficile de savoir quel type de mort est induit par les fragments pectiques dans chacun des types cellulaires. Dans le cas des cellules HepG2, lorsque nous inhibons la voie de l'apoptose dépendante des caspases, nous avons remarqué que la mort cellulaire induite par les fragments ne semblait pas être affectée. Après inhibition de l'autophagie et de la nécroptose, nous n'observons aucun effet marqué sur la cytotoxicité induite par les fragments. Les résultats concernant l'inhibition de l'apoptose dépendante des caspases et de l'autophagie s'observent également dans les cellules A549. Néanmoins, il semblerait que la nécroptose soit impliquée dans la toxicité des fragments pectiques (**Figure 5.1**).

5.2. Caractérisation du(es) récepteur(s) impliqué(s) dans la reconnaissance des fragments pectiques

Après avoir tenté de caractériser le type de mort cellulaire induite par les fragments pectiques, la deuxième partie du mémoire consistait à déterminer le ou les récepteur(s) qui pourrai(en)t être impliqué(s) dans la reconnaissance de ces fragments car les mécanismes de reconnaissance de ces fragments sont encore inconnus à l'heure actuelle. Nous avons choisi d'étudier le rôle de quatre récepteurs candidats qui sont la galectine-3, le CD44, le CD168 et le TLR-4. La galectine-3 est connue pour reconnaître les fragments pectiques générés par hydrolyse par pH (MCP), tandis que les trois autres récepteurs présentent des propriétés intéressantes telles que la reconnaissance des polysaccharides comme l'acide hyaluronique. La pectine étant composée de polysaccharides, ces récepteurs semblent être de bons candidats potentiels.

Nous avons montré que les cellules HepG2 exprimaient l'ARNm de la galectine-3 et du CD168 mais pas celui du CD44, tandis que les cellules A549 exprimaient l'ARNm de la galectine-3, du CD44 et du CD168. Le TLR-4 était très faiblement exprimé dans les deux types cellulaires. Au niveau protéique, les cellules HepG2 expriment la galectine-3 et le CD168 mais pas le CD44, confirmant les résultats obtenus concernant l'ARNm. Pour les cellules A549, l'expression de la galectine-3, du CD44 et du CD168 y est détectée, confirmant également les résultats obtenus pour l'ARNm. En ce qui concerne le dernier récepteur étudié, le TLR-4, nous ne détectons pas son expression protéique et ce, dans les deux types cellulaires, confirmant aussi le résultat de la qPCR. Ce récepteur n'a pas été étudié plus en profondeur dans les expériences suivantes puisqu'il semble être exprimé qu'à un très faible niveau. Bien que ce récepteur ne s'est pas montré attractif dans cette étude, ce récepteur est très intéressant puisque Liu et al. ont montré que la pectine de pomme fragmentée via la pectinase prévenait l'inflammation et la tumorigenèse en ciblant la voie ligand/TLR-4/NF- κ B dans un modèle de souris de cancer du colon (Liu et al., 2010).

En plus d'avoir étudié l'expression des différents récepteurs candidats, nous avons évalué leur abondance lorsque les cellules sont incubées en présence des fragments pectiques. Nous avons remarqué que l'expression de la galectine-3 diminue après 48 heures d'incubation en présence d'HFCP mais pas d'étoposide dans les deux types cellulaires, suggérant son endocytose comme ce qu'on observe pour différents récepteurs quand il y a liaison du ligand au récepteur. Pour ce qui est du CD168, son expression n'est détectée qu'à 24 heures et est diminuée lorsque les cellules HepG2 sont incubées en présence d'HFCP, suggérant également une possible endocytose. L'absence de détection du CD168 après 48 heures serait peut-être due à l'absence de sérum dans le milieu. Au niveau des cellules A549, l'expression du CD44 diminue après 24 et 48 heures d'incubation en présence d'HFCP tandis qu'il ne semble pas avoir de diminution d'expression du CD168. Nous remarquons donc que l'expression de deux récepteurs sur trois diminue lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP. Il serait intéressant d'évaluer l'abondance d'un récepteur supplémentaire qui ne posséderait pas de propriétés supposées intéressantes dans la reconnaissance des fragments pectiques, comme par exemple le PDGFR ou l'EGFR, afin de voir si son abondance diminue ou pas en présence d'HFCP et ainsi de s'assurer de la spécificité des effets observés.

Après avoir vérifié l'expression des différents récepteurs candidats dans les deux lignées cellulaires, nous avons inhibé leur expression par des siRNAs afin d'étudier l'effet de cette invalidation sur la cytotoxicité cellulaire induite par les fragments pectiques. Tout d'abord, nous avons vérifié que l'expression de ces récepteurs était bien inhibée par les siRNAs respectifs. Nous avons, pour cela, analysé leur expression en ARNm et nous avons remarqué que celle-ci était bien inhibée. Cependant, pour les cellules A549, nous remarquons des effets aspécifiques non explicables comme c'est le cas pour le siRNA contrôle négatif (Risc Free) puisqu'il a augmenté de plus de 50% l'expression en ARNm des trois récepteurs candidats. Cette expérience devra être refaite afin de vérifier la reproductibilité de ces effets non désirés.

Ensuite, nous avons étudié l'expression protéique des différents récepteurs candidats après inhibition par leur siRNAs respectifs. Nous avons remarqué que l'expression des différents récepteurs candidats était bien inhibée lorsque les cellules étaient transfectées avec les siRNAs respectifs, confirmant les résultats obtenus par qPCR.

Après avoir montré que les siRNAs diminuaient l'expression des différents récepteurs ciblés via qPCR et western blot, nous avons évalué l'effet de ces siRNAs sur la cytotoxicité cellulaire induite par les fragments pectiques. En effet, si les fragments pectiques exercent

leurs effets toxiques en reconnaissant un de ces récepteurs, nous devrions constater une augmentation de la viabilité cellulaire lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP lorsque le récepteur est invalidé.

Lorsque nous inhibons l'expression de la galectine-3 dans les cellules HepG2 et A549, nous n'observons pas d'augmentation de la viabilité cellulaire quand les cellules sont incubées en présence des fragments pectiques peu importe le temps d'incubation, par rapport aux cellules transfectées avec le Risc Free. Ainsi, il semblerait que la galectine-3 ne soit pas impliquée dans l'enclenchement des effets cytotoxiques des fragments pectiques dans les cellules HepG2 et A549. Cependant, dans les cellules A549, il semblerait que la galectine-3 soit importante pour la survie des cellules car la viabilité est plus faible en présence des siRNAs ciblant la galectine-3 par rapport aux cellules transfectées du contrôle négatif. Ce résultat est très intéressant car, contrairement à la MCP, la HFCP n'est pas reconnue par la galectine-3. Nous confirmons donc les résultats obtenus par Jackson et al. en 2007. Il existe donc d'autres récepteurs responsables de la reconnaissance des fragments pectiques de la HFCP.

Lorsque nous inhibons l'expression du CD168 dans les cellules HepG2, nous n'observons pas d'augmentation de la viabilité cellulaire quand les cellules sont incubées en présence des fragments pectiques pendant 24 heures, par rapport aux cellules transfectées avec le Risc Free. Cependant, après 48 heures d'incubation, nous observons une augmentation significative de la viabilité cellulaire, suggérant que les fragments pectiques seraient reconnus par CD168. Dans le cas des cellules A549, ce récepteur ne semble pas intervenir dans les effets toxiques des fragments pectiques. Cependant, il semble nécessaire à la survie des cellules car lorsqu'il est inhibé, nous remarquons une diminution de viabilité.

Bien que CD44 ne soit pas exprimé dans les cellules HepG2, nous avons quand même testé l'effet de son siRNA sur la viabilité cellulaire. Lorsque nous inhibons l'expression de CD44 dans les cellules HepG2, nous n'observons pas d'augmentation de la viabilité cellulaire quand les cellules sont incubées en présence des fragments pectiques pendant 24 heures, par rapport aux cellules transfectées avec le Risc Free. Cependant, de manière très surprenante, nous observons une augmentation significative de la viabilité cellulaire après 48 heures d'incubation en présence d'HFCP, suggérant que les fragments pectiques seraient reconnus par ce récepteur. Comme mentionné précédemment, CD168 interagit avec CD44 afin de transduire son signal car il ne possède pas de domaine transmembranaire. Il se pourrait que lorsqu'il y a interaction entre les deux, le signal de HFCP sur CD168 induise la transcription de CD44, qui serait alors recruté en membrane afin de jouer un rôle dans la reconnaissance des fragments pectiques. Cet effet serait alors visible lorsque les cellules sont incubées en présence de siRNAs. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer l'abondance en ARNm de CD44 lorsque les cellules sont incubées en présence d'HFCP. Si ce résultat s'avère positif, c'est-à-dire, si nous observons une augmentation de la quantité d'ARNm de CD44, il serait, dès lors, très intéressant de transfecter les cellules HepG2 avec les siRNAs ciblant le CD168 et les siRNAs ciblant le CD44 afin de voir l'effet sur la viabilité cellulaire. Nous nous attendrions à observer une augmentation de viabilité un peu plus importante.

Dans le cas des cellules A549, lorsque nous inhibons l'expression du CD44 ou CD168, nous n'observons pas d'augmentation de la viabilité cellulaire quand les cellules sont incubées en présence des fragments pectiques pendant 24 et 48 heures, par rapport aux cellules transfectées avec le Risc Free, suggérant que ces récepteurs n'interviennent pas dans les effets cytotoxiques des fragments pectiques. Cependant, nous remarquons également que ces récepteurs semblent aussi nécessaires à la survie des cellules A549 car la viabilité cellulaire diminue lorsque les cellules sont transfectées par les siRNAs respectifs.

Ainsi, dans les cellules HepG2, il semblerait que CD168 et CD44, peut-être en complexe, reconnaissent les fragments pectiques. Cependant, ces récepteurs semblent ne pas être impliqués dans les cellules A549. Nous n'avons donc pas identifié le récepteur candidat dans les cellules A549. Il serait aussi intéressant de réaliser des tests de cytotoxicité cellulaire, afin de comparer et de confirmer ou d'invalider les résultats obtenus par les tests de viabilité cellulaire.

Une autre perspective intéressante concerne le récepteur au TNF. En effet, comme mentionné auparavant, ce récepteur intervient à la fois dans la voie de l'apoptose et de la nécroptose. Comme montré ci-dessus, l'apoptose et la nécroptose semblent activées dans la mort cellulaire induite par les fragments pectiques. Il se pourrait donc que les fragments pectiques en se liant à ce récepteur déclenchent ces deux voies de mort cellulaires. Il serait donc intéressant de vérifier si les deux types cellulaires étudiés expriment cette protéine. S'ils l'expriment, il s'agirait alors d'inhiber son expression par des siRNAs et d'en étudier l'effet sur la cytotoxicité cellulaire induite par les fragments pectiques. Si la viabilité augmente lorsque les cellules transfectées au siRNA ciblant le TNFR-1 sont incubées en présence de fragments pectiques, cela suggérerait à la fois que le TNFR-1 intervienne dans la reconnaissance des fragments pectiques mais également que l'apoptose et/ou la nécroptose seraient impliquées dans la mort cellulaire induite par la pectine fragmentée.

Il serait également intéressant de porter cette étude à plus grande échelle, c'est-à-dire, tenter de déterminer le(s) récepteur(s) susceptible(s) de reconnaître les fragments pectiques par une approche sans a priori, par exemple, par une approche protéomique. En effet, la diminution, la perte ou l'augmentation d'expression de certaines protéines visualisées sur un gel en deux dimensions seraient très intéressantes. Il s'agirait ensuite d'identifier les protéines par spectrométrie de masse. Après avoir déterminé la nature de la (des) protéine(s), nous inhiberons leur expression avec des siRNAs spécifiques et étudierons l'effet de cette invalidation sur la cytotoxicité cellulaire induite par les fragments pectiques.

Cependant, il est important de noter que les fragments pectiques ne sont peut-être tout simplement pas reconnus par des récepteurs. Ils pourraient aussi « simplement » se faire endocytés par la cellule. C'est pourquoi la microscopie électronique à transmission serait très intéressante. En effet, en plus d'étudier la présence ou non de vésicules à double-membrane impliquées dans la voie de l'autophagie, nous pourrions déterminer la présence ou l'absence de vésicules dérivant de l'endocytose. Ces vésicules se différencient de celles de l'autophagie car elles n'ont qu'une seule membrane.

Pour conclure, bien que de nombreuses questions restent encore actuellement sans réponse, cette étude nous a permis de tenter de déterminer le type de mort cellulaire induite par les fragments pectiques dans deux lignées de cellules cancéreuses. La nécroptose semble jouer un rôle dans la mort cellulaire induite par les fragments pectiques dans les cellules A549. Cette étude nous a également permis de tenter de déterminer le(s) récepteur(s) impliqué(s) dans la reconnaissance des fragments pectiques et il semblerait que dans les cellules HepG2, le CD168 et le CD44 jouent un rôle. Nous n'avons cependant pas réussi à identifier un récepteur candidat dans les cellules A549. Ces résultats permettent donc de formuler de nouvelles perspectives pour l'utilisation des fragments pectiques dans le traitement des patients atteints du cancer.

Bibliographie

6. Bibliographie

Abetamann V, Kern H, Elsässer HP. (1996). Differential expression of the hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2: 1607-1618.

Adams JM, Cory S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 26: 1324-1337.

Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A. (1997). Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res.* 57: 5272-5276.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell* Fifth Edition, Garland Science, USA, 2008.

Alvarado-Kristensson M, Andersson T. (2005). Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in neutrophils by dephosphorylating both p38 MAPK and its substrate caspase 3. *J Biol Chem.* 280:6238-6244.

Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem.* 269: 20807-20810.

Beckman RA, Weiner LM, Davis HM. (2007). Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer.* 109: 170-179.

Boatright KM, Salvesen GS. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 15: 725-731.

Bourguignon LY, Zhu D, Zhu H. (1998). CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. *Front Biosci.* 3: 637-649.

Brown L, Rosner B, Willett WW, Sacks FM. (1999). Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 69: 30-42.

Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer DD. (2005). Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 115: 2640-2647.

Büchner FL, Bueno-de-Mesquita HB, Ros MM, Overvad K, Dahm CC, Hansen L, Tjønneland A, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Touillaud M, Kaaks R, Rohrmann S, Boeing H, Nöthlings U, Trichopoulou A, Zylis D, Dilis V, Palli D, Sieri S, Vineis P, Tumino R, Panico S, Peeters PH, van Gils CH, Lund E, Gram IT, Braaten T, Sánchez MJ, Agudo A, Larrañaga N, Ardanaz E, Navarro C, Argüelles MV, Manjer J, Wirfält E, Hallmans G, Rasmuson T, Key TJ, Khaw KT, Wareham N, Slimani N, Vergnaud AC, Xun WW, Kiemeny LA, Riboli E. (2010). Variety in fruit and vegetable consumption and the risk of lung cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 19: 2278-2286.

Caldas C, Brenton JD. (2005). Sizing up miRNAs as cancer genes. *Nat Med.* 11: 712-714.

Cammarota R, Bertolini V, Pennesi G, Bucci EO, Gottardi O, Garlanda C, Laghi L, Barberis MC, Sessa F, Noonan DM, Albini A. (2010). The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *J Transl Med.* 8: 112.

Campbell NA, Reece JB, Lachaine R, Bosset M. *Biologie* 7e édition, Pearson Education, France, 2007.

Challa S, Chan FK. (2010). Going up in flames: necrotic cell injury and inflammatory diseases. *Cell Mol Life Sci.* 67: 3241-3253.

Chang ZL. (2010). Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res.* 59: 791-808.

Chauhan D, Li G, Podar K, Hideshima T, Neri P, He D, Mitsiades N, Richardson P, Chang Y, Schindler J, Carver B, Anderson KC. (2005). A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 65: 8350-8358.

Chen Y, Klionsky DJ. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci.* 124: 161-170.

Christofferson DE, Yuan J. (2010). Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol.* 22: 263-268.

Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326: 1-16.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* 30: 1073-1081.

Croce CM. (2008). Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* 358: 502-511.

Crotzer VL, Blum JS. (2005). Autophagy and intracellular surveillance: Modulating MHC class II antigen presentation with stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 7779-7780.

Danguy A, Camby I, Kiss R. (2002). Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1572: 285-293.

Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. (2009). RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell.* 138: 229-232.

Demaria M, Giorgi C, Lebiedzinska M, Esposito G, D'Angeli L, Bartoli A, Gough DJ, Turkson J, Levy DE, Watson CJ, Wieckowski MR, Provero P, Pinton P, Poli V. (2010). A STAT3-mediated metabolic switch is involved in tumour transformation and STAT3 addiction. *Aging (Albany NY).* 2: 823-842.

Dumic J, Dabelic S, Flögel M. (2006). Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta.* 1760: 616-635.

Eliaz I, Hotchkiss AT, Fishman ML, Rode D. (2006). The effect of modified citrus pectin on urinary excretion of toxic elements. *Phytother Res.* 20: 859-864.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 127: 2893-2917.

Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 3: 391-400.

Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, Cohen J, Breglio K, Krishnareddy S, Hsu D, Xu R, Harpaz N, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K, Cooper HS, Itzkowitz SH, Abreu MT. (2007). Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology.* 133: 1869-1881.

Gewies A. (2003). Introduction to apoptosis. *ApoReview.*

Ghiotto F, Fais F, Bruno S. (2010). BH3-only proteins: the death-puppeteer's wires. *Cytometry A.* 77: 11-21.

Giansanti V, Torriglia A, Scovassi AI. (2011). Conversation between apoptosis and autophagy: "Is it your turn or mine?". *Apoptosis.* 16: 321-333.

Glinsky VV, Raz A. (2009). Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydr Res.* 344: 1788-1791.

González-Reyes S, Fernández JM, González LO, Aguirre A, Suárez A, González JM, Escaff S, Vizoso FJ. (2011). Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence. *Cancer Immunol Immunother.* 60: 217-226.

Goodison S, Urquidi V, Tarin D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol.* 52: 189-196.

Guess BW, Scholz MC, Strum SB, Lam RY, Johnson HJ, Jennrich RI. (2003). Modified citrus pectin (MCP) increases the prostate-specific antigen doubling time in men with prostate cancer: a phase II pilot study. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 6: 301-304.

Gunning AP, Bongaerts RJ, Morris VJ. (2009). Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. *FASEB J.* 23: 415-424.

Gust KM, Hofer MD, Perner SR, Kim R, Chinnaiyan AM, Varambally S, Moller P, Rinnab L, Rubin MA, Greiner J, Schmitt M, Kuefer R, Ringhoffer M. (2009). RHAMM (CD168) is overexpressed at the protein level and may constitute an immunogenic antigen in advanced prostate cancer disease. *Neoplasia.* 11: 956-963.

Hahn WC, Weinberg RA. (2002). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med.* 347: 1593-1603.

Hainsworth JD, Greco FA. (1995). Etoposide: twenty years later. *Ann Oncol.* 6: 325-341.

- Hamilton SR, Fard SF, Paiwand FF, Tolg C, Veisheh M, Wang C, McCarthy JB, Bissell MJ, Koropatnick J, Turley EA. (2007). The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 282: 16667-16680.
- Hanahan D, Folkman J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 86: 353-364.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100: 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646-674.
- Hande KR. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*. 34: 1514-1521.
- Harholt J, Suttangkakul A, Vibe Scheller H. (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol*. 153: 384-395.
- Hayashi A, Gillen AC, Lott JR. (2000). Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. *Altern Med Rev*. 5: 546-552.
- Henderson NC, Sethi T. (2009). The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev*. 230: 160-171.
- Hertweck MK, Erdfelder F, Kreuzer KA. (2011). CD44 in hematological neoplasias. *Ann Hematol*. 90: 493-508.
- Hexeberg S, Hexeberg E, Willumsen N, Berge RK. (1994). A study on lipid metabolism in heart and liver of cholesterol- and pectin-fed rats. *Br J Nutr*. 71: 181-192.
- Horbinski C, Mojesky C, Kyprianou N. (2010). Live free or die: tales of homeless (cells) in cancer. *Am J Pathol*. 177: 1044-1052.
- Hughes RC. (2001). Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*. 83: 667-676.
- Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 1807: 735-745.
- Inohara H, Raz A. (1994). Effects of natural complex carbohydrate (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. *Glycoconj J*. 11: 527-532.
- Ioannou S, Voulgarelis M. (2010). Toll-like receptors, tissue injury, and tumourigenesis. *Mediators Inflamm*. 2010.
- Ishigami S, Ueno S., Nishizono Y, Matsumoto M, Kurahara H, Arigami T, Uchikado Y, Setoyama T, Arima H, Yoshiaki K, Kijima Y, Kitazono M, Natsugoe S. (2011). Prognostic impact of CD168 expression in gastric cancer. *BMC Cancer*. 11: 106.

- Jackson CL, Dreaden TM, Theobald LK, Tran NM, Beal TL, Eid M, Gao MY, Shirley RB, Stoffel MT, Kumar MV, Mohnen D. (2007). Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*. 17: 805-819.
- Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R. (2011). Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 8: 528-539.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 61: 69-90.
- Jin Z, El-Deiry W. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 4: 139-163.
- Johnson KD, Glinskii OV, Mossine VV, Turk JR, Mawhinney TP, Anthony DC, Henry CJ, Huxley VH, Glinsky GV, Pienta KJ, Raz A, Glinsky VV. (2007). Galectin-3 as a potential therapeutic target in tumors arising from malignant endothelia. *Neoplasia*. 9: 662-670.
- Kaushik S, Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kiffin R, Martinez-Vicente M, Kon M, Orenstein SJ, Wong E, Cuervo AM. (2011). Chaperone-mediated autophagy at a glance. 124: 495-499.
- Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA, Boone CW, Kopelovich L, Hawk ET, Lieberman R, Lawrence JA, Ali I, Viner JL, Sigman CC. (2000). Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J Nutr*. 130: 467-471.
- Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S, Visintin I, Rutherford T, Mor G. (2006). TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res*. 66: 3859-3868.
- Key TJ, Schatzkin A, Willett WC, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. (2004). Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr*. 7: 187-200.
- Key TJ. (2011). Fruit and vegetables and cancer risk. *Br J Cancer*. 104: 6-11.
- Kidd P. (1996). A new approach to metastatic cancer prevention: modified citrus pectin (MCP), a unique pectin that blocks cell surface lectins. *Alternative Medicine Review* 1: 4-10.
- Kim HR, Lin HM, Biliran H, Raz A. (1999). Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res*. 59: 4148-4154.
- Kimmelman AC. (2011). The dynamic nature of autophagy in cancer. *GenesDev*. 25: 1999-2010.
- Klionsky DJ. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8: 931-937.
- Kroemer G, Pouyssegur J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 13 : 472-482.

Kushi LH, Byers T, Doyle C, Bandera EV, McCullough M, McTiernan A, Gansler T, Andrews KS, Thun MJ; American Cancer Society 2006 Nutrition and Physical Activity Guidelines Advisory Committee. (2006). American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin.* 56: 254-281.

Kutikhin AG. (2011). Impact of Toll-like receptor 4 polymorphisms on risk of cancer. *Hum Immunol.* 72: 193-206.

Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 115: 2665-2672.

Leibowitz B, Yu J. (2010). Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther.* 9: 417-422.

Levine AJ, Puzio-Kuter AM. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science.* 330: 1340-1344.

Levine B, Yuan J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest.* 115: 2679-2688.

Linseisen J, Rohrmann S, Miller AB, Bueno-de-Mesquita HB, Büchner FL, Vineis P, Agudo A, Gram IT, Janson L, Krogh V, Overvad K, Rasmuson T, Schulz M, Pischon T, Kaaks R, Nieters A, Allen NE, Key TJ, Bingham S, Khaw KT, Amiano P, Barricarte A, Martinez C, Navarro C, Quirós R, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Touvier M, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Palli D, Panico S, Tumino R, Tjønneland A, Olsen A, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Autier P, Boffetta P, Slimani N, Riboli E. (2007). Fruit and vegetable consumption and lung cancer risk: updated information from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 121: 1103-1114.

Liu FT, Rabinovich GA. (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 5: 29-41.

Liu HY, Huang Z, Yang GH, Lu WQ, Yu NR. (2008). Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. *World J Gastroenterol.* 14: 7386-7391.

Liu L, Li YH, Niu YB, Sun Y, Guo ZJ, Li Q, Li C, Feng J, Cao SS, Mei QB. (2010). An apple oligogalactan prevents against inflammation and carcinogenesis by targeting LPS/TLR4/NF- κ B pathway in a mouse model of colitis-associated colon cancer. *Carcinogenesis.* 31: 1822-1832.

Livingston DM, Shivdasani R. (2001). Toward mechanism-based cancer care. *JAMA.* 285: 588-593.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 741-752.

Mantovani A. (2009). Cancer: Inflaming metastasis. *Nature.* 457: 36-37.

- Martinou JC, Youle RJ. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell*. 21: 92-101.
- Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 36: 2420-2434.
- Maxwell CA, McCarthy J, Turley E. (2008). Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? *J Cell Sci*. 121: 925-932.
- Misra S, Heldin P, Hascall VC, Karamanos NK, Skandalis SS, Markwald RR, Ghatak S. (2011). Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J*. 278: 1429-1443.
- Mohnen D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*. 11: 266-277.
- Mukherjee S, Das DK. (2011). Oxidative stress in cardiovascular disease: potential biomarkers and their measurements. *Oxidative stress in applied basic research and clinical practice*. 2: 131-156.
- Muhsin M, Graham J, Kirkpatrick P. (2004). *Nat Rev Drug Discov*. 3: 995-996.
- Nakahara S, Oka N, Raz A. (2005). On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*. 10: 267-275.
- Nakajima N, Ishihara K, Tanabe M, Matsubara K, Matsuura Y. (1999). Degradation of pectic substances by two pectate lyases from a human intestinal bacterium, *Clostridium butyricum*-beijerinckii group. *J Biosci Bioeng*. 88: 331-333.
- Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. (2000). Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol*. 156: 899-909.
- Nangia-Makker P, Conklin J., Hogan V, Raz A. (2002). Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends Mol Med* 8: 187-192.
- Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Tait L, Bresalier R, Raz A. (2002). Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst*. 94: 1854-1862.
- Nangia-Makker P, Nakahara S, Hogan V, Raz A. (2007). Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target. *J Bioenerg Biomembr*. 39: 79-84.
- Nangia-Makker P, Balan V, Raz A. (2008). Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3. *Cancer microenviron*. 1: 43-51.
- Newlaczyl AU, Yu LG. (2011). Galectin-3 - A jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Lett*. 313: 123-128.
- Noble PW, Liang J, Jiang D. (2011). Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev*. 91: 221-264.

Notte A, Leclere L, Michiels C. (2011). Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochem Pharmacol*. 82: 427-434.

Orian-Rousseau V. (2010). CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur J Cancer*. 46: 1271-1277.

Osterhage JL, Friedman KL. (2009). Chromosome end maintenance by telomerase. *J Biol Chem*. 284: 16061-16065.

Ozaki T, Nakagawara A. (2011). p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J Biomed Biotechnol*. 2011

Palmero EI, de Campos SG, Campos M, de Souza NC, Guerreiro ID, Carvalho AL, Marques MM. (2011). Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genet Mol Biol*. 34: 363-370.

Parsons MJ, Green DR. (2009). Mitochondria and apoptosis: a quick take on a long view. *F1000 Biol Rep*. 1

Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4: 33-45.

Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totaro MG, Allavena P, Mantovani A, Sica A. (2009). Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*. 214: 761-777.

Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 9: 57-63.

Ravikumar B, Futter M, Jahreiss L, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Narayanan U, Renna M, Jimenez-Sanchez M, Sarkar S, Underwood B, Winslow A, Rubinsztein DC. (2009). Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci*. 122: 1707-1711.

Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 57: 929-967.

Rudzki Z, Jothy S. (1997). CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Mol Pathol*. 50: 57-71.

Saito D, Nakaji S, Fukuda S, Shimoyama T, Sakamoto J, Sugawara K. (2005). Comparison of the amount of pectin in the human terminal ileum with the amount of orally administered pectin. *Nutrition*. 21: 914-919.

Satelli A, Rao PS, Gupta PK, Lockman PR, Srivenugopal KS, Rao US (2008). Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncol Rep*. 19: 587-594.

Sathisha UV, Jayaram S, Harish Nayaka MA, Dharmesh SM. (2007). Inhibition of galectin-3 mediated cellular interactions by pectic polysaccharides from dietary sources. *Glycoconj J*. 24: 497-507.

Sauter A, Kloft C, Gronau S, Bogeschdorfer F, Erhardt T, Golze W, Schroen C, Staab A, Riechelmann H, Hoermann K. (2007). Pharmacokinetics, immunogenicity and safety of bivatuzumab mertansine, a novel CD44v6-targeting immunoconjugate, in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Oncol.* 30: 927-935.

Ségal-Bendirdjian E, Dudognon C, Mathieu J, Hillion J, Besançon F. (2005). Cell death signalling: recent advances and therapeutic application. *Bull Cancer.* 92: 23-35.

Seglen PO, Gordon PB. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79: 1889-1892.

Shpilka T, Elazar Z. (2011). Shedding light on mammalian microautophagy. *Dev Cell.* 20: 1-2.

Slee EA, Zhu H, Chow SC, MacFarlane M, Nicholson DW, Cohen GM. (1996). Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J.* 315: 21-24.

Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, Matou S, West D, Delisser H, Savani RC, Kumar S. (2007). Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol.* 26: 58-68.

So EY, Ouchi T. (2010). The application of Toll like receptors for cancer therapy. *Int J Biol Sci.* 6: 675-681.

Stark JR, Wiklund F, Grönberg H, Schumacher F, Sinnott JA, Stampfer MJ, Mucci LA, Kraft P. (2009). Toll-like receptor signaling pathway variants and prostate cancer mortality. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 18: 1859-1863.

Steeg PS. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer.* 3: 55-63.

Sticklen MB. (2008). Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet.* 9: 433-443.

Streetly MJ, Maharaj L, Joel S, Schey SA, Gribben JG, Cotter FE. (2010). GCS-100, a novel galectin-3 antagonist, modulates MCL-1, NOXA, and cell cycle to induce myeloma cell death. *Blood.* 115: 3939-3948.

Strum S, Scholz M, McDermed J, McCulloch M, Eliaz I. Modified citrus pectin slows PSA doubling time: A pilot clinical trial. Presentation: International Conference on Diet and Prevention of Cancer, Tampere, Finland. May 28, 1999 – June 2, 1999.

Tait SW, Green DR. (2008). Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene.* 27: 6452-6461.

Takenaka Y, Fukumori T, Raz A. (2004). Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J.* 19: 543-549.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 231-241.

Theuwissen E, Mensink RP. (2008). Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiol Behav.* 94: 285-292.

Toole BP. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 4: 528-539.

Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. (2002). Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem.* 277: 4589-4592.

Tzankov A, Strasser U, Dirnhofer S, Menter T, Arber C, Jotterand M, Rovo A, Tichelli A, Stauder R, Günthert U. (2011). In situ RHAMM protein expression in acute myeloid leukemia blasts suggests poor overall survival. *Ann Hematol.* 90: 901-909.

Vandenabeele P, Declercq W, Vanden Berghe T. (2008). Necrotic cell death and 'necrostatins': now we can control cellular explosion. *Trends Biochem Sci.* 33: 352-355.

Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11: 700-714.

Van Herreweghe F, Festjens N, Declercq W, Vandenabeele P. (2010). Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cell Mol Life Sci.* 67: 1567-1579.

Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. (2008). TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci.* 65: 2964-2978.

Voorrips LE, Goldbohm RA, Verhoeven DT, van Poppel GA, Sturmans F, Hermus RJ, van den Brandt PA. (2000). Vegetable and fruit consumption and lung cancer risk in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. *Cancer Causes Control.* 11: 101-115.

Vossenaar M, Solomons NW, Valdés-Ramos R, Anderson AS. (2011). Agreement between dietary and lifestyle guidelines for cancer prevention in population samples of Europeans and Mesoamericans. *Nutrition.* 27: 1146-1155.

Wang C, Thor AD, Moore DH 2nd, Zhao Y, Kerschmann R, Stern R, Watson PH, Turley EA. (1998). The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression. *Clin Cancer Res.* 4: 567-576.

Willats WGT, Knox JP, Mikkelsen D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology.* 17: 97-104.

Wiseman M. (2008). The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc Nutr Soc.* 67: 253-256.

Wolska A, Lech-Marańda E, Robak T. (2008). Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cell Mol Biol Lett.* 14: 248-272.

Yan J, Katz. A. (2010). PectaSol-C modified citrus pectin induces apoptosis and inhibition of proliferation in human and mouse androgen-dependent and- independent prostate cancer cells. *Integr Cancer Ther.* 9: 197-203.

Yang H, Zhou H, Feng P, Zhou X, Wen H, Xie X, Shen H, Zhu X. (2010). Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *J Exp Clin Cancer Res.* 29: 92-100.

Yang RY, Liu FT. (2003). Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 60: 267-276.

Yeung SJ, Pan J, Lee MH. (2008). Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci.* 65: 3981-3999.

Yoon YH, Cho KS, Hwang JJ, Lee SJ, Choi JA, Koh JY. (2010). Induction of lysosomal dilatation, arrested autophagy, and cell death by chloroquine in cultured ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 6030-6037.

Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem.* 266: 17707-17712.

Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim HR. (2002). Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem.* 277: 15819-15827.

Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 60: 6-20.

Zhang JJ, Wu HS, Wang L, Tian Y, Zhang JH, Wu HL. (2010). Expression and significance of TLR4 and HIF-1 α in pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 16: 2881-2888.

Zhang YB, He FL, Fang M, Hua TF, Hu BD, Zhang ZH, Cao Q, Liu RY. (2009). Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. *Mol Biol Rep.* 36: 1475-1481.

Zhao ZY, Liang L., Fan X, Yu Z, Hotchkiss AT, Wilk BJ, Eliaz I. (2008). The role of modified citrus pectin as an effective chelator of lead in children hospitalized with toxic lead levels. *Altern Ther Health Med.* 14: 34-38.

Zöller M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer.* 11: 254-267.

http://www.abdserotec.com/antibodies/apoptosis_cell_membrane_receptors-1015.html

http://catalog.takara-bio.co.jp/en/product/basic_info.asp?unitid=U100005579

<http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>

